ISSN 0037-8437

ANALES
DE LA
SOCIEDAD CIENTIFICA
ARGENTINA

Director: Dr. PEDRO CATTANEO

ENERO 1983 – DICIEMBRE 1984

TOMO CCXIV



SUMARIO

Avda. SANTA FE 1145
1059 BUENOS AIRES
ARGENTINA
1986

SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

ANALES

DE LA

SOCIEDAD CIENTIFICA

ARGENTINA

ISSN 0037-8437

Director: Dr. PEDRO CATTANEO

ENERO 1983 – DICIEMBRE 1984

TOMO CCXIV



Avda. SANTA FE 1145
1059 BUENOS AIRES
ARGENTINA
1986

MIEMBROS PROTECTORES

DE LA

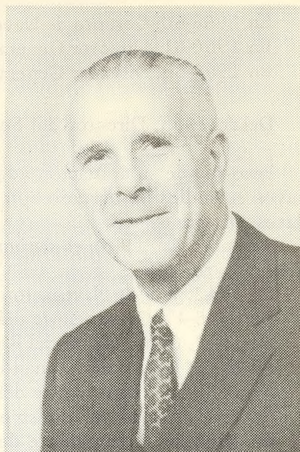
SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

AGUA Y ENERGIA ELECTRICA, Empresa del Estado
COMISION DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS de la Prov. de Bs.As.
FUNDACION BUNGE Y BORN
I. B. M. ARGENTINA S. A.
JOCKEY CLUB ARGENTINO
YACIMIENTOS PETROLIFEROS FISCALES

 ISSN 0037-8437

CAPITAN DE NAVIO (RE) EMILIO L. DIAZ

12–6–1913 – 2–6–1983



El 2 de junio de 1983, en las primeras horas de la tarde, fuimos notificados que, sorpresivamente en momentos que conversaba con sus amigos y compañeros de armas, en la Sede del Centro Naval, había fallecido el Cap. de Navío (RE) Emilio L. Díaz, nuestro gran presidente en el período comprendido entre los años 1970–1976; caballero sin tacha y amigo insubstituible.

Constituye un deber ineludible recordarlo con fervor en este número de Anales correspondiente al año 1983, por que fué su Director en los años 1967/1969 y un asiduo y eficaz socio, siempre dispuesto a la iniciativa y al trabajo inspirado seguramente por su gran amor a la Institución antes y cuando luego vio cumplido su comportamiento brillante al servicio de la Armada Argentina, carrera que abrazara en los años juveniles con vocación ejemplar.

Por eso, aquella tarde triste del mes de junio ha quedado señalada con la profunda pena de su desaparición y el constante recuerdo del colaborador, el Consejero y el afectuoso compañero de tareas.

Con la celebración de un nuevo aniversario de nuestra fundación el 28 de julio de 1980, recibió al pasar a la categoría de Socio Vitalicio el Diploma y Medalla correspondiente y junto con ellos, los honores y muestras de simpatía y cariño a que se hizo acreedor en èl ejercicio permanente y eficaz de los distintos cargos con que fue distinguido en los muchos años de permanente actividad en la Sociedad Científica Argentina.

Dije entonces, que pocos hombres como él pueden ostentar una foja de servicios más admirable, una dedicación más inteligente y decidida y pocos hombres como él, fueron merecedores de alcanzar las más altas distinciones y hacerlo con la ética y austeridad que fueron siempre patrimonio de su personalidad. Traía cuando ingresó como socio antecedentes de relieve. Su padre, el Dr. Emilio Carlos Díaz, falleció en 1948, era casado con María Rosa Ambrosioni y Barabino, es decir, que por parte de madre emparentaba con uno de los fundadores y destacados presidentes y directores de los Anales, el Dr. Santiago Barabino que lo fuera desde el año 1903 hasta el primer semestre de 1913, lo que expresa su inteligente y eficaz desempeño.

El Dr. Emilio Carlos Díaz, fue Presidente de la Excelentísima Cámara de Apelaciones en lo Criminal de la Capital, Vicepresidente y Vocal de la Sociedad Científica Argentina, Profesor Extraordinario de Derecho Penal, publicó 45 trabajos en total entre ellos el Código Penal para la República Argentina con 5 ediciones entre 1928 y 1947.

Su hijo, cuya vida motiva estas líneas era nacido el 12 de junio de 1913 en Buenos Aires y contrajo matrimonio con la Señora Brígida Cormick, quien dio a su hogar tres hijas mujeres.

Su carrera de Marino es sencillamente magnífica y ejemplar. Se inicia al egresar como Guardiamarina en diciembre de 1933, distinguido como el primero de su promoción con los premios "Ministro de Marina", "Bartolomé Mitre" y "Pro-patria".

Recibe el premio "Almirante Brown" otorgado por el Centro Naval al mejor trabajo libre de carácter profesional, titulado "La Previsión del Tiempo a Largo Plazo", tema que fue siempre de su predilección.

Obtiene sus ascensos regularmente hasta alcanzar en 1953 el grado de Capitán de Navío, con el que se retira, a su pedido en el año 1956 .

Siguió el Curso de Aplicación para Oficiales en la especialidad de Comunicaciones; un Curso de Derecho Internacional; el Curso Mayor y Menor de la Escuela de Guerra Naval y un Seminario para Ejecutivos de Empresas Petroleras en las Naciones Unidas, Nueva York.

En 1938, es Profesor de Meteorología a bordo de la fragata Presidente Sarmiento.

En 1940, es Jefe de Cálculos Náuticos en la Escuela Naval Militar.

En 1945 y 1946, Agregado Naval Ayudante de la Embajada Argentina en los Estados Unidos y Asesor en la Junta Interamericana de Defensa. Comandó distintas naves de la Armada.

En 1949, es Presidente de la Comisión de Organización del Servicio de Meteorología Marítima.

En 1935, ingresa a la Sociedad Científica Argentina como Socio Adherente.

En 1940, pasa a la categoría de Socio Activo.

Desde 1949, es miembro de la Junta Directiva.

En 1953-55, Jefe de Operaciones del Estado Mayor General Naval.

En 1958-60, Gerente de Navegación de Y.P.F.
En 1960-61, Director General de Y.P.F. (Interino).
En 1962-63, Director General de Y.P.F. (interino).

Desde 1963, Director del Seminario "Francisco P. Moreno" de la Sociedad Científica Argentina. .

Pero donde su actuación adquiere relieve excepcional es en las Campañas Antárticas algunos de cuyos episodios ha narrado con pluma ágil en forma brillante por momentos emotiva en su libro "Relatos Antárticos".

Veamos: En 1940, es designado observador Argentino en la Expedición Norteamericana del Almirante Byrd.

En 1942, Jefe de Navegación del Transporte 1ro. de Mayo.
En 1946-47, Comandante del Rastreador "Granville".
En 1947, Comandante del Rastreador "Fournier", en viaje invernal.
En 1948, Asesor del Comandante en Jefe en la Cámara Antártica de la Flota de Mar.
En 1951-52, Comandante del Grupo de Tareas Antártico.
En 1953, Asesor del Ministro de Marina en su viaje a la Antártida.
En 1955-56, Comandante de la Fuerza Naval Antártica con un total de 55.010 millas navegadas en ese Continente.
En 1974, es Director en la Sociedad Científica Argentina, de la Comisión Organizadora de la 1er. Campaña Científica a las Islas Malvinas.
En 1978, Director de la 2da. Campaña Científica a las Islas Malvinas.
Desde 1976, Académico de Número de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.
Ha publicado 91 trabajos (de los cuales 52 sobre Meteorología).

Es decir, una vida expectable y de fecundas realizaciones al Servicio del país y de la Sociedad Científica Argentina, de cuyos Anales fue Director en el período 1965-70.

En 1966/71, fue Sub-asesor Provincial de Desarrollo de la Provincia de Buenos Aires.
En 1970/76, Presidente de la Sociedad Científica Argentina.
En 1971/73, Asesor Principal de Desarrollo de la Provincia de Buenos Aires.

Cuando deja la Presidencia de la Sociedad Científica Argentina por el término legal de su eficaz mandato, deseando evitar su alejamiento, se lo nombra Director de la Colección de Evolución de las Ciencias y se erige en mi incomparable colaborador y consejero.

En oportunidad de pasar a la Categoría de Socio Vitalicio, expresé que con él compartí los momentos felices y las horas difíciles y su método de trabajo, su capacidad científica y su hombría de bien, fueron de ayuda invalorable. Juntos, entonces, dimos los primeros pasos para lograr la donación del terreno de la Calle Santa Fé, gestión que había de ocupar muchos años de mi presidencia.

Diría con Jean Conilh en "Un Nouvel age de l'Intelligence", que si un ser inteligente se reconoce por que orienta todo hacia lo esencial; moviliza su pensamiento y el de los demás; y permite la comunicación, el Cap. Diaz la ostenta sin duda alguna, porque poseía poder de penetración y de diálogo y se particularizaba por su manera, al mismo tiempo personal y esencial de intervenir. Cuanto decía estaba signado por su temperamento, su sensibilidad y su carácter. Por ese impulso personal propiamente dicho de ir al meollo del asunto.

En esta pequeña semblanza de la vida de nuestro Capitán, me veo forzado y lo hago complacido, a reproducir algunos de los términos con que me expresé en oportunidad de elevarlo a la categoría de Socio Vitalicio, por la sencilla razón que aquellas palabras alcanzaron poca difusión, mientras que éstas por publicarse en Anales la obtendrán en grado mucho mayor. Luego vendrán las que se pronuncien en el homenaje que le rendiremos en oportunidad de entronizar su retrato en la galería de presidentes que aadorna la Sala de reuniones de la Junta Directiva.

En lo que atañe a la Colección de Evolución de las Ciencias, hay un episodio que desearía comentar. Habíamos logrado que el Instituto de Etnología de la Facultad de Filosofía y Letras se comprometiera a redactar el tomo diez dedicado a la Antropología y a ese efecto habíamos programado para el 1ro. de junio una entrevista con los Dres. Mario Califano y Andrés Perez Diez. Caí yo enfermo y lo comisioné para que asistiera solo a esa entrevista y asumiera la responsabilidad de resolverlo todo.

En horas de la noche, me llamó a mi casa y me dio con alegría la noticia que todo estaba resuelto y que en el término de diez meses estaría redactado aquel tomo por nosotros tan esperado. Sus palabras fueron: "—Ing. Misión Cumplida: y estoy muy contento porque así completamos los Diez Tomos publicados del 2do. Cincuentenario de la Colección, lo que supera mis cálculos más optimistas". Emocionado por sus palabras expresé: "Permítame decirle qeu este tomo con la consiguiente autorización de la Junta Directiva sea dedicado con todo afecto a usted que tanto y tan bién ha trabajado para el prestigio de esta Colección ... "Me dio las gracias y me pidió que me cuidara y no saliera de mi casa hasta mejorar mi gripe. He ahí el diálogo con que me había despedido para siempre de este amigo y colaborador ejemplar.

Con igual interés y capacidad, organizó como Director las dos Campañas Científicas a las Islas Malvinas realizadas en los años 1974 y 1979, cuyos resultados fueron publicados en estos Anales.

La Antártida, escenario de sus más grandes éxitos, con su páramo nevado, su silencio y sensación de aislamiento absoluto; con sus tempestades y vientos imponentes, debe suscitar múltiples impresiones, estados de ánimos particulares por más que quienes son señalados para ir a esas regiones hayan sido sometidos a rigurosos exámenes psicofísicos y prolijo entrenamiento.

No hay duda, que el amor al estudio y la observación de los fenómenos naturales; el amor a una vida de intenso trabajo y la posibilidad de recurrir al tesoro de la cultura misma y a la amistad de los compañeros de tarea, deben ser elementos que distraen, hacen llevadera e intensa la vida de soledad, tan proclive a la meditación y a elaborar caracteres introvertidos.

Pues bien: ninguna de esas dos situaciones en la magnífica carrera del Cap. Díaz, sea la vida del mundo o sea la vida de soledad, modificaron el prudente equilibrio de su firme personalidad, la nobleza de sus acciones; la profundidad de su pensamiento; sus virtudes de investigador y hombre de ciencia.

Así termina el homenaje que le rendimos en vida, y con estas líneas terminó el homenaje que le rindo hoy en nombre de la Junta Directiva de la Sociedad Científica Argentina y en el mío propio.

Pienso que si su fructífera vida —su nave— salvó con éxito todos los escollos, debe haber ganado el premio que todos anhelamos.

¡Audaz y soberbia nave que en llegando al puerto es aclamada!

SERIE I - CIENCIAS Nº 47

ISSN 0037-8437

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE *NEOCORBICULA LIMOSA* (MATON) 1809 (MOLLUSCA PELECYPODA)

Cristian Federico Ituarte *

RESUMEN

Se describen aspectos de la morfología gonadal y ciclo sexual de *Neocorbicula limosa* (Maton), una especie hermafrodita funcional. Las fracciones genitales de ambos sexos presentan localizaciones topográficas definidas. La extensión de los tejidos espermáticos supera al desarrollo de la fracción ovárica.

La secuencia anual de los fenómenos gametogenéticos es descripta a partir de las transformaciones que se operan en los tejidos masculinos exclusivamente, dada las particularidades funcionales de la fracción femenina que se discuten. Se proponen ocho etapas claramente definitbles hitológicamente.

El pico de máxima actividad de emisión se ubica en el período diciembre-enero; una rápida recuperación gonadal en febrero permite un segundo memento de evacuación en marzo-abril.

SUMMARY

Gonadal morphology and sexual cycle of *Neocorbicula limosa* (Maton) –a functional hermaphrodite– are here described. Genital samples of both sexes have defined topographic locations. Espermatic tissues are more extended than the ovarial ones.

Annual secuence of gametogenic events is described based on transformations produced only on testicular tissues, because of the particularities of the female portion, wich are discused below. Eight stages, histologicaly clearly defined, are proposed.

A spawning peak occur's from december to january and –after a rapid gonadal restauration– another one accur's from march to april.

INTRODUCCION

La presente contribución pretende llenar en parte un vacío en el actual conocimiento de nuestra fauna de las aguas continentales, cual es el de las poblaciones de moluscos del Río de la Plata.

Este, como todo estudio que tienda a la investigación integral de la biología de la malacofauna dulceacuícola reviste especial interés dada la importancia que puede alcanzar el grupo en cuestión dentro de las comunidades límnicas y, vista la necesidad de contar con datos biológicos básicos al intentar explicar su integración en el fùncionamiento de tales agrupaciones.

* Museo de La Plata. 1900 La Plata - Argentina

Los objetivos planteados se desarrollan a partir de una investigación orientada al conocimiento de la biología de los Corbiculidae en el área rioplatense; de la cual éste trabajo es parte.

Integrando la superfamilia Sphaeriacea, juntamente con la familia Sphaeriidae –pequeños bivalvos poco conocidos en nuestro medio en lo que a su sistemática y biología se refiere–, la familia Corbiculidae se encuentra representada al sur de la región Neotropical por un género nativo, *Neocrobicula* Fischer, 1887. La sóla excepción a este enunciado la constituye el género *Polymesoda* Rafinesque, 1820, que alcanza en su distribución meridional el extremo nor-noroeste de América del Sur.

Neocrobicula limosa (Maton) 1809 y *Neocorbicula paranensis* (d'Orbigny), 1835 son los dos representantes del género americano para las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay, en lo que a la Rca. Argentina se refiere. *N. limosa* se extiende a lo largo del río Uruguay alcanzando en su expansión sur al Río de La Plata; ocupa asimismo algunos ambientes del alto Paraná, curso fluvial en que se localiza *N. paranensis.*

Recientemente (Ituarte, 1981) ha sido reportada la presencia en extensas áreas de la costa rioplatense de representantes no autóctonos de la familia Corbiculidae, cuyas poblaciones ocupan exclusivamente el litoral arenoso. Las formas introducidas, que pertenecen al género *Corbicula* Megerle von Mühlfeld, 1811, son originarias del continente asiático, donde se distribuyen ampliamente a través de Japón, China, Corea, Formosa, India, Filipinas, etc. –el análisis de la biología de representantes del género asiático es objeto de otra contribución–.

Los datos obtenidos permiten efectuar un análisis comparativo de distintos aspectos que hacen a la biología reproductiva de las formas autóctonas –gen. *Neocorbicula*– y de aquellas introducidas –gen. *Corbicula*– Esta contraposición resulta de especial interés ya que, además de convalidar especulaciones de índole sistemática referidas al rango taxonómico que corresponde a los Corbiculidae americanos; permite evaluar –aunque más no sea en forma cualitativa– la notable diferencia en los potenciales bióticos de uno y otro género, orientado ésto a la estimación del impacto que sobre las poblaciones locales de *N. limosa* y otros intgrantes de la malacofauna autóctona ocasionaría la invasión de sus ambientes naturales –pequeños canales y arroyos de fondos blandos– por parte de las formas extranjeras en caso de generarse una "presión de dispersión" tal que resultaran vencidas las barreras ecológico ambientales que hasta el momento limitan su ingreso a tales biotopos.

MATERIAL Y METODOS

A partir del mes de junio de 1980 y hasta noviembre de 1981 se procedió a la toma de muestras a intervalos mensuales –excepción hecha de dos oportunidades– en el arroyo Miguelín, pequeño curso de agua que alcanza al Río de La Plata a la altura de la localidad de Punta Lara, Partido de Ensenada.

Submuestras representativas, tomadas al azar, de cada relevamiento, destinadas al estudio histológico fueron sometidas a fijación en líquidos específicos, además de la solución de formalina. Se ensayaron las mezclas de Helly, Zenker, la variante Zenker + Formol, entre los fijadores mercuriales; y entre los alcohólicos los líquidos de Vastarini y Carnoy. Previo a la inmersión en el fijador se seccionaron los músculos aductores a fin de asegurar su perfecta penetración, evitando posibles alteraciones de los lábiles tejidos gonadales.

Excelentes resultados fueron obtenidos con la variante mercurial Zenker + Formol, obteniéndose preparaciones de mayor nitidez y contraste de estructuras tanto en vistas panorámicas como en detalles de núcleo y citoplasma.

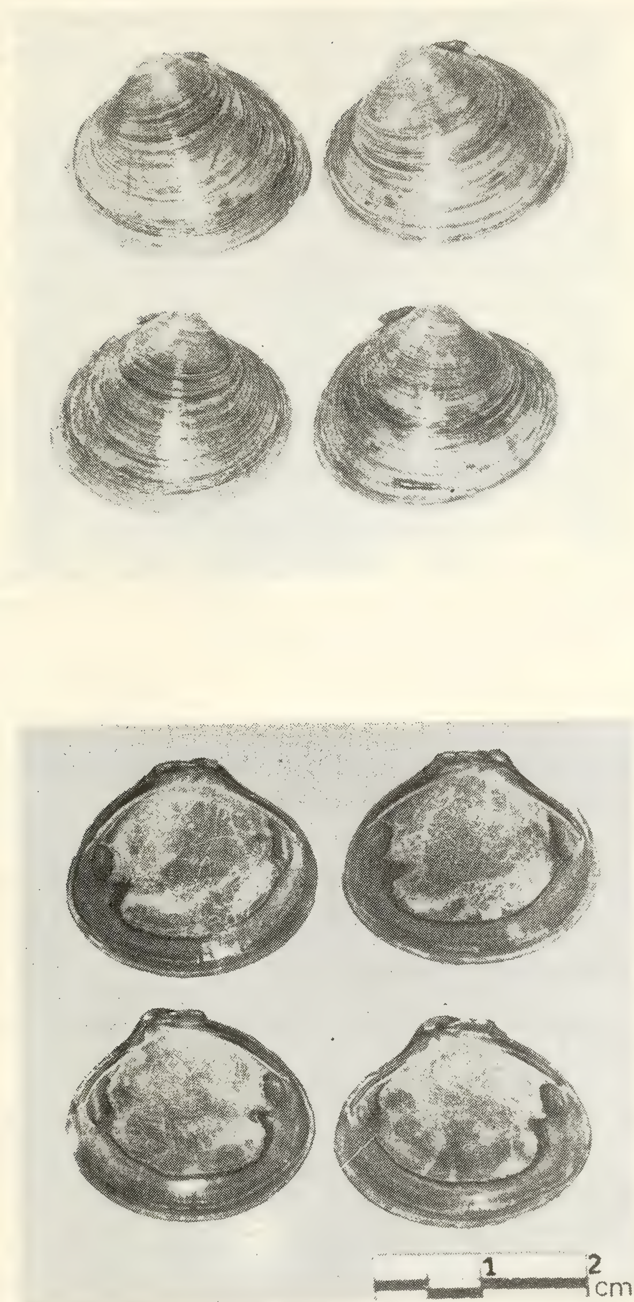


FIGURA 1: *NEOCORBICULA LIMOSA* (MATON)

1. – ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS REFERIDOS A LA BIOLOGIA DE *NEOCORBICULA LIMOSA* \

La primera referencia a la biología del género *Neocorbicula* se encuentra en una breve nota de W. H. Dall (1902) en la que se da a conocer la ocurrencia de incubación de los embriones aunque sin dar más detalles sobre las características con que se presenta el fenómeno, que el número de crías (15 a 20) registradas por individuo materno.

Marshall (1924, 1927) detalla algunas observaciones referidas a las crías contenidas en las branquias maternas: morfología conquiliar, rango de tallas, refiriéndose especialmente a las variaciones observadas en el patrón de coloración que caracteriza a los juveniles.

Baraibar, en 1959, presenta su "... Estudio sobre *Corbicula limosa*..." el que resulta una reseña anatómica general, aportando pocos datos sobre la biología de la especie. Respecto a la sexualidad sólo comenta: "... en ejemplares jóvenes de acuerdo a su tamaño, he encontrado en algunos casos la presencia de óvulos y espermatozooides...", suponiendo a partir de estos datos que se trataría de individuos en tránsito de un cambio de sexo. Hace referencia, brevemente, al número y tamaño de embriones en incubación.

Parodiz & Hennings (1965) infieren la condición de hermafrodita funcional de las especies del género en estudio, describiendo algunos rasgos del fenómeno de incubación, características de la estructura de las poblacionesy variación morfológica específica interpoblacional.

Finalmente, Parodiz (1977) sugiere la autofecundación como modalidad reproductiva habitual –aunque no comprobado experimentalmente–, mecanismo éste que explicaría la importante variabilidad interpoblacional y, recíprocamente la homogeneidad fenotípica en individuos pertenecientes a una misma población.

2. – ESTRUCTURA DE LA POBLACION DE *N. LIMOSA* EN A° MIGUELIN

La Figura 2 muestra la evolución de la estructura poblacional de *N. limosa*, determinada a partir de 16 lotes de individuos, muestreo que cubre un período de deiciocho meses. Los histogramas grafican la distribución de frecuencias de talla según clases milimétricas.

Dos características resultan salientes:

a – la amplitud del intervalo de tallas que ocupa cada distribución de frecuencias mensual, a lo largo de todo el año.

b – la evolución anual de los grupos modelos característicos queda parcial o totalmente enmascarada por el contínuo aporte de juveniles a la población, cuya talla puede variar desde 1 a 5 mm. de acuerdo al momento de su desarrollo en que sean eliminados de la branquia materna. (Ituarte, en prensa)

Las características de dicha estructura poblacional son explicadas, pues, por las particularidades del fenómeno incubatorio, lo que dificulta, además, los intentos por relacionar momentos reproductivos con los períodos en que se detecta incorporación de juveniles, fundamentalmente debido a la notable extensión de la incubación y la no existencia de una talla definida de expulsión. La multimodalidad y la no definida secuencia temporal en la evolución de estos "modos" queda explicaa por los múltiples aflujos de juveniles a la población; aunque los momentos "pico" en la expulsión de embriones, con tallas promedio de 1

mm. o poco más, que corresponden a los meses de abril-mayo el primero, podría reflejarse en el incremento de la representatividad de las clases menores a partir de agosto-setiembre, y el segundo (noviembre-diciembre) se denotaría a partir de febrero (Ituarte, op. cit.).

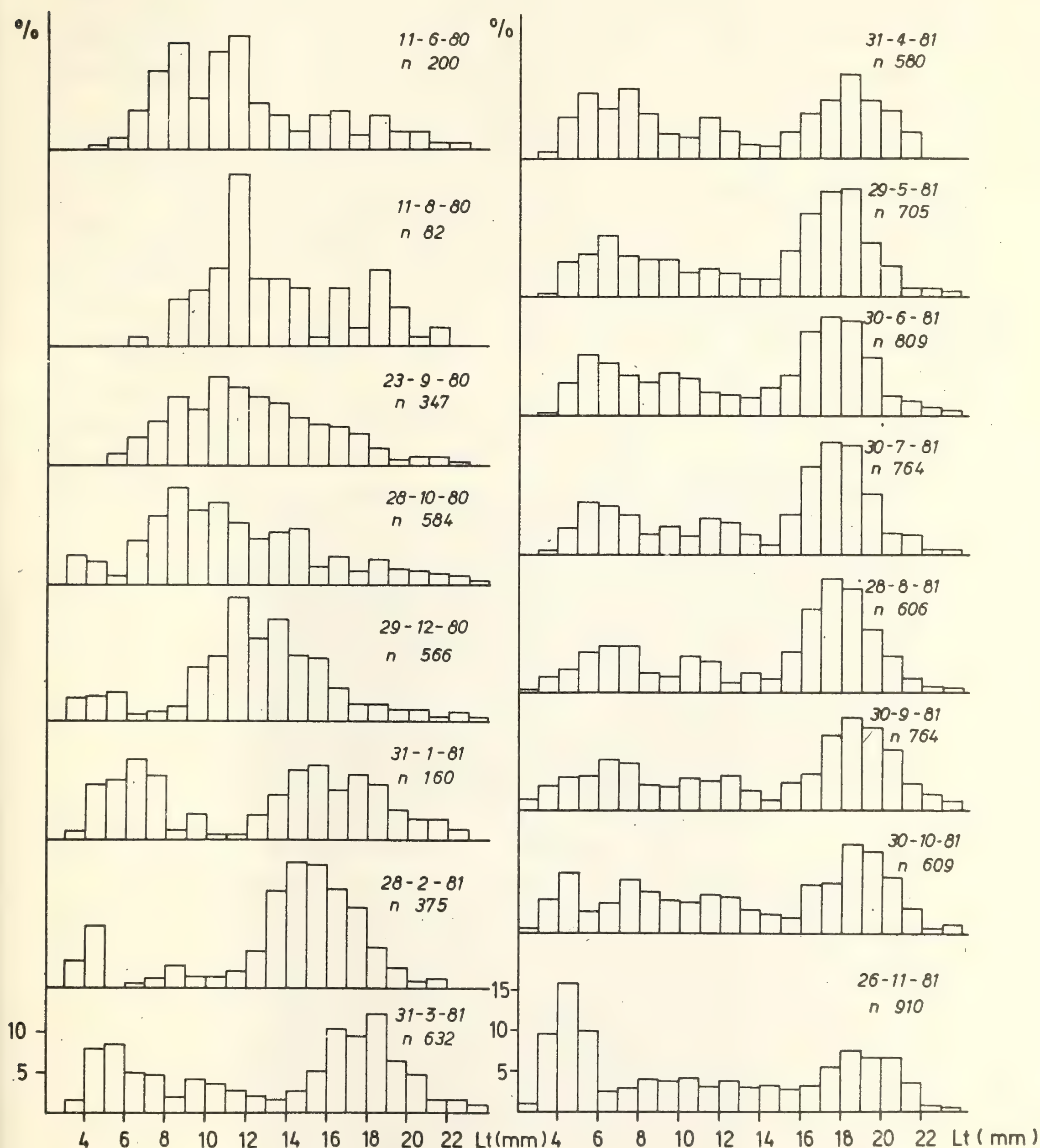


FIGURA 2: *ESTRUCTURA DE LA POBLACION DE NEOCORBICULA LIMOSA EN Aº MIGUELIN*

3. – REPRODUCCION

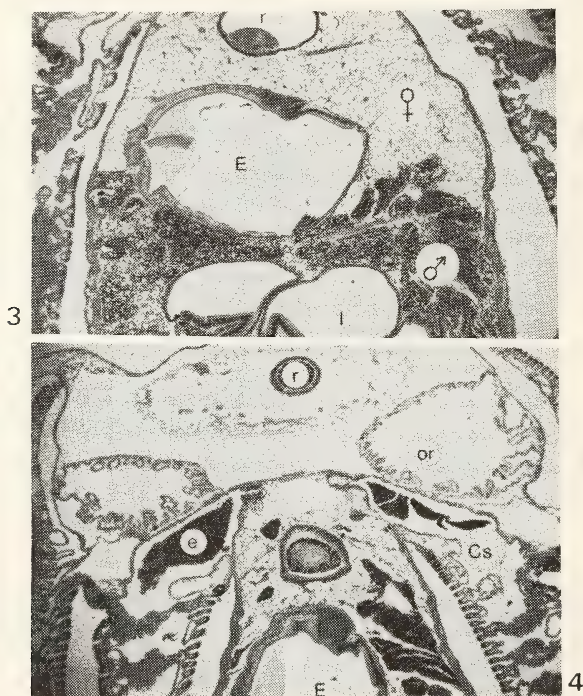
3.1. – Anatomía gonadal

La gonada de *Neocorbicula limosa* es una glándula hermafrodita. Los tejidos gonadales se desarrollan en una estructura tubular acinosa sumamente ramificada, cuyos elementos se infiltran entre los órganos de la masa visceral, difundiéndose en el conjuntivo circundante hasta llegar a ocupar la casi totalidad del espacio disponible entre ellos. Queda ventralmente limitada por la musculatura del pie; el grueso tegumento que forma la pared de la masa visceral resulta su continente lateral.

Las características con que se presenta el hermafroditismo en esta especie permiten definirlo, según el concepto de Coe (1943), como de tipo funcional; esto es, en un mismo ejemplar tiene lugar la producción simultánea de óvulos y espermios.

Las fracciones genitales correspondientes a cada sexo poseen localizaciones topográficas definidas. La porción masculina, que alcanza un desarrollo areal superior, ocupa la mitad ventral del volumen visceral. Dos reducidas "áreas masculinas" se localizan en los vértices medio-dorsales del mismo. Los tejidos femeninos se restringen a la mitad superior del complejo visceral, por encima y detrás del estómago y primera porción del tubo intestinal. Figuras 3 - 4.

Los procesos de diferenciación gonadal tienen lugar tempranamente en *N. limosa.* Ya en individuos de 7 mm. de longitud, ambas fracciones genitales se encuentran definidas; aunque el desarrollo completo de la glándula se alcanza en ejemplares de tallas superiores a los 10 mm.



FIGS. 3 - 4

Segregación espacial de los tejidos masculinos y femeninos en el volúmen de la masa visceral. 40 x

E - estómago; I - intestino; r - recto; or - órgano renal; Cs - cámara suprabranquial; e - volúmen de gametas masculinas evacuado.

3.2. – Estructura alveolar

La pared alveolar –en ambos sexos– queda integrada por dos tipos celulares: los elementos de la serie germinal y un segundo tipo, las llamadas células foliculares (término no apropiado ya que el desarrollo de las células sexuales en pelecípodos no responde al modo folicular, Raven (1958). También denominadas "células nutricias", estos elementos adoptan –en estadíos tempranos del desarrollo gonadal o en gónadas recientemente recuperadas– una forma cilíndrica alta (especialmente notables en la fracción femenina), de citoplasma vesiculoso y gran volúmen; se distribuyen en un estrato único ocupando la casi totalidad de la luz alveolar.

Los elementos goniales se disponen en la pared alveolar a nivel de la base de las células foliculares. Similar posición corresponde a los elementos basales en ambos sexos. Figuras 5 - 6.

Una delgada vaina de células conjuntivas limita al epitelio folicular descripto, sobre el que su citoplasma se apoya ampliamente. Entre estos elementos conjuntivos se disponen un número relativamente importante de células musculares.

La estructuración alveolar descripta se corresponde con la tipificación que realiza Coe (1943 b) para los géneros *Teredo, Bankia, Mya, Petricola, Barnea;* en oposición a las características de la gónada de –por ejemplo– *Ostrea, Pecten, Mytilus, Volsella,* en las que los elementos dominantes en la composición de las unidades funcionales de la glándula genital son las células germinales, siendo los elementos foliculares de muy pequeño tamaño. (en ambos casos la caracterización corresponde a las etapas tempranas del desarrollo gonadal).

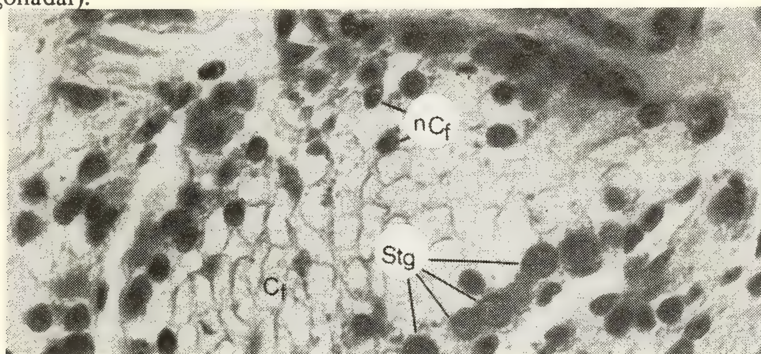


FIG. 5.: *Alvéolo femenino en fase primaria de su desarrollo. 600 x*
Cf. - células foliculares - Og. - Ovogonias - n Cf. - núcleo de la célula folicular.

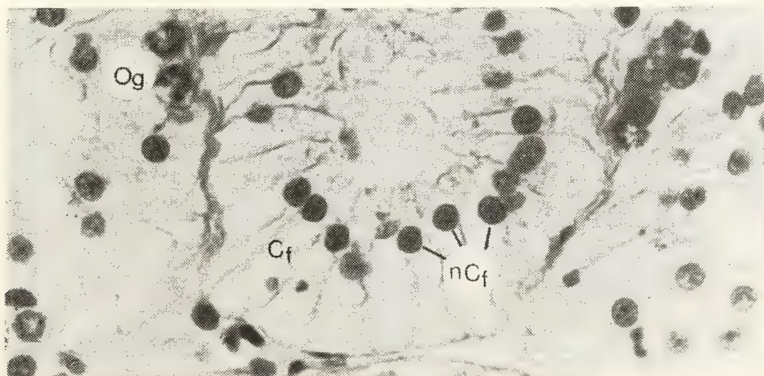


FIG. 6.: *Alvéolo masculino en fase primaria de su desarrollo. 600 x*
Stg. espermatogonias

En el mismo orden de comparaciones cabe destacar la similitud de la arquitectura alveolar de *Neocorbicula limosa* con la descripta para *Sphaerium striatinum* Lamarck (Woods, 1931) y otros Sphaeriidae.

Clásicamente se asigna a los elementos foliculares intraalveolares un rol nutricio (Coe, 1943 b; Sastry, 1979) calificándoselo en ciertos casos como accesorio. Según cita Woods (op. cit) las células nutricias son incorporadas en forma íntegra por los ovocitos o, en su defecto, sólo parte de su contenido ingresa al ooplasma. El fenómeno parece involucrar únicamente a las células adyascentes a cada ovocito en desarrollo.

Si bien en el caso de *Neocorbicula* no se ha revelado claramente la ocurrencia de tales procesos de "citofagia", se ha observado una evolución de algún modo paralela entre el desarrollo de las células sexuales las células foliculares acompañantes.

Los hechos observados –detectables en la fracción femenina– son los siguientes:

– a medida que progresa la maduración de los elementos sexuales, las células foliculares disminuyen su altura, adoptando una configuración cúbica. Este hecho, al menos en parte, puede no deberse a actividad celular alguna y ser explicado para la distensión alveolar que acompaña al proceso madurativo, originada en el incremento volumétrico de las ovas en desarrollo.

– en etapas avanzadas de la maduración se observan regularmente fragmentos citoplasmáticos y cuerpos nucleares provenientes de la lisis de células foliculares que se observa particularmente en la base y células adyascentes a cada ovocito en crecimiento. Posiblemente esto sea el resultado de simples desprendimientos o desgarro de tales elementos foliculares al hacer protrusión hacia la luz alveolar los ovocitos en desarrollo.

No se hallaron pues, evidencias que permitan suponer algún mecanismo de incorporacón directa de células nutricias a los ovocitos.

El tejido conjuntivo interalveolar resulta escaso, laxamente organizado, con abundantes elementos ameboides; no manifiesta variaciones estacionales de importancia en su desarrollo y/o composición.

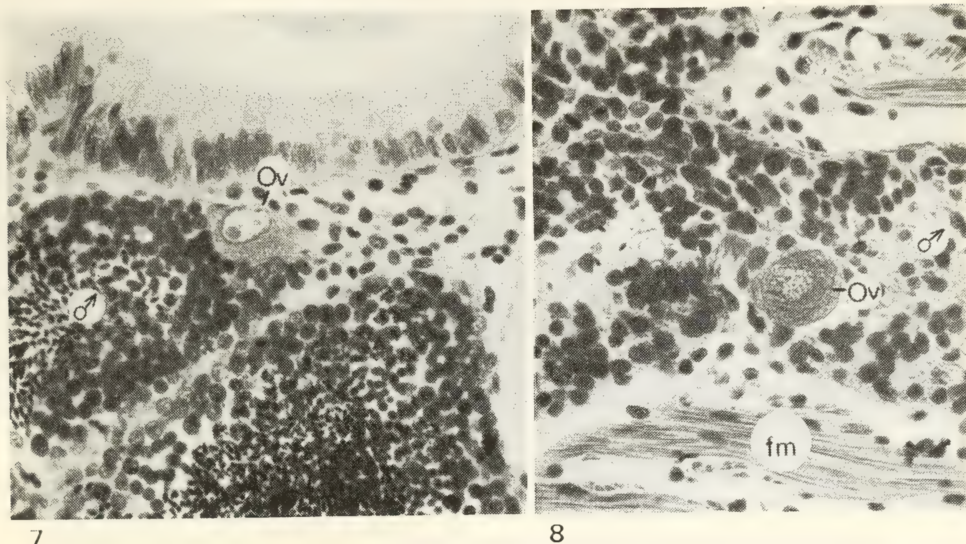
3.3. – Casos atípicos de hermafroditismo intra-alveolar (acinos mixtos)

La neta segregación topográfica existente entre los tejidos ováricos y testiculares no excluye la posibilidad de ocurrencia, aunque con carácter de excepción dada su escasa frecuencia, de acinos mixtos; esto es, elementos masculinos y femeninos coexistiendo en una misma unidad funcional.

Se han observado elementos de filiación femenina en localización atípica, no el caso inverso. Se trata de ovocitos previtelogénicos o en curso de vitelogénesis –en ningún caso más de una célula– cuyo desarrollo se verifica en el seno de alvéolos nétamente masculinos. Figuras 7 - 8.

No se han detectado signos de anormalidad en la evolución de tales elementos, ni reacción alguna por parte del acino masculino.

Llamativamente, en los ejemplares en que se detecta el fenómeno descripto es común encontrar cuatro o cinco casos en diferentes secciones de la gónada. Esto podría ser indicador de una cierta "predisposición" de algunos individuos en particular a desarrollar casos de hermafroditismo intra-alveolar, originada en alteraciones del delicado mecanismo de determinación del sexo.



FIGS. 7 - 8: *Casos de hermafroditismo intra-alveolar. 250 x*
Ov - ovocitos en vitelogénesis; ♂ acino masculino; fm - fascículo muscular transverso

3.4. **Vías de evacuación.**

Las vías de evacuación gamética son comunes a ambos sexos. Un par de ductos principales –que se originan en la zona central de la porción femenina– abren al exterior uno a cada lado del cuerpo, en posición postero-dorsal, próximos al nacimiento de los músculos retractores posteriores. Quedan de tal modo incluidos en el espacio de la cámara suprabranquial. Figura 9. No se observan a nivel de las aberturas genitales formaciones a modo de papilas o labios como los descriptos para el género *Corbicula.*

La pared de los ductos principales está formada por un epitelio cúbico simple ciliado, que próximo a su abertura al exterior se eleva en células cilíndricas que forman un reborde anular interno dando cierre al mismo. Una delgada vaina conjuntivo muscular envuelve al ducto en toda su extensión. Figuras 10 - 11.

La presencia de células contráctiles en las vías de evacuación principales y la existencia de miocélulas en las paredes alveolares sugieren un mecanismo de emisión, si no eminentemente peristáltico, que combina la acción ciliar y muscular contráctil.

La aparición en la luz de los ductos principales y en las cámaras suprabranquiales –en gónadas en evacuación– de numerosos elementos ajenos a la emision gaméti-a –células sexuales inmaduras, cuerpos de reabsorción, núcleos y fragmentos citoplasmáticos de células foliculares– originados en desgarros tisulares provocados por un fenómeno de evacuación violento, resulta compatible con un mecanismo de emisión como el propuesto. Figura 12.

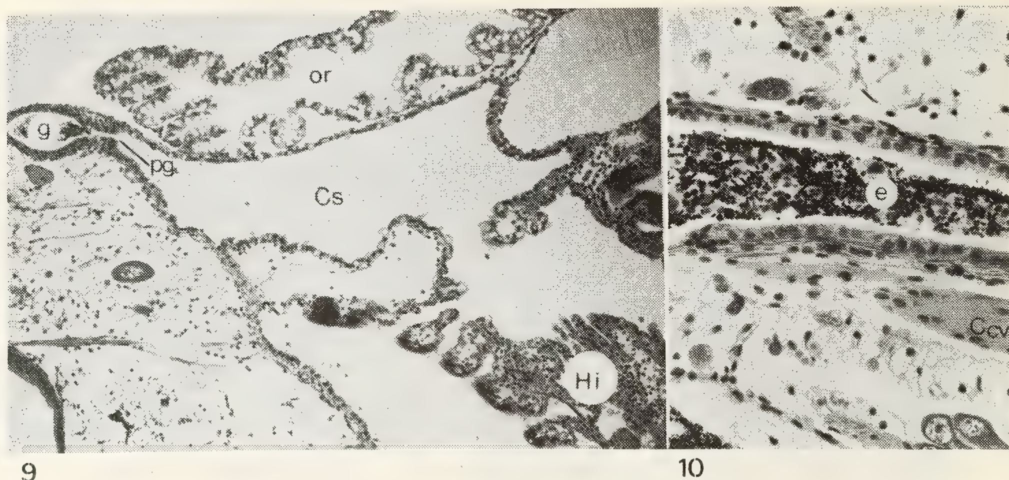
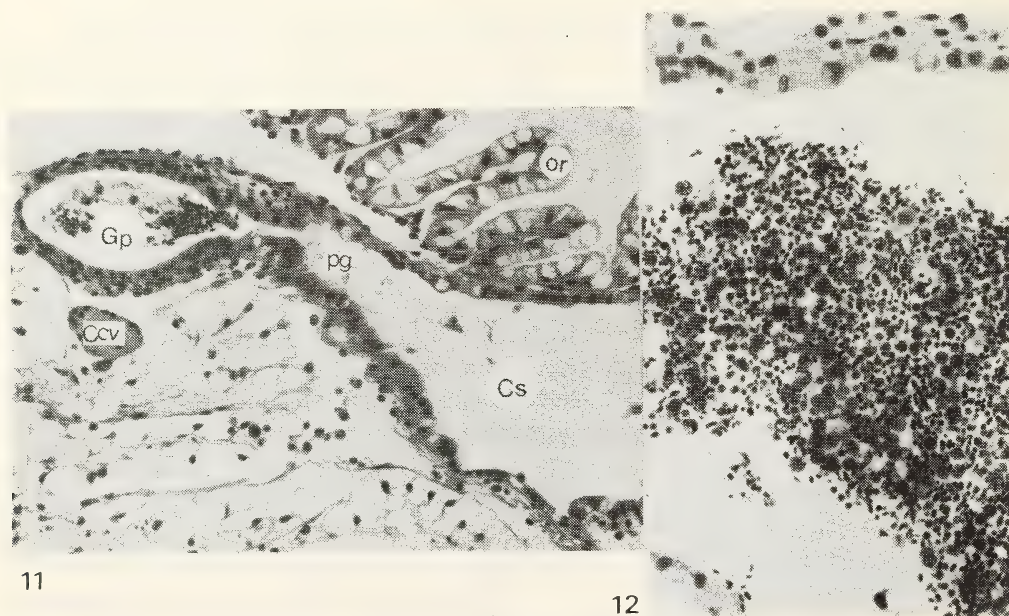


FIG. 9: *Vías de evacuación - localización topográfica. 100 x*
g. - gonoducto principal; pg. - poro genital; Cs. - cámara suprabranquial; Hi. - hemibranquia interna; or. - órgano renal.

FIG. 10: *Detalle del gonoducto principal en su apertura a la cámara suprabranquial. 250 x.*
Ccv. - conectivo cerebro-visceral.



FIGS. 11: *Sección longitudinal del gonoducto principal. 250 X. se observan detalles tisulares de su pared; e. - volúmen avacuado.*

FIG. 12: *Elementos ajenos a la emisión gamética en el volúmen evacuado. 400 X*

La expulsión de los productos sexuales masculinos, cuyos tejidos de origen se localizan en la mitad inferior de la masa gonadal, se realiza a través de los ductos principales de la fracción femenina. Figura 13.

La emisión de gametas masculinas y femeninas tiene lugar habitualmente en forma simultánea. Esto posibilita la ocurrencia, aunque como un hecho accidental, de casos de autofecundación. Figura 14.

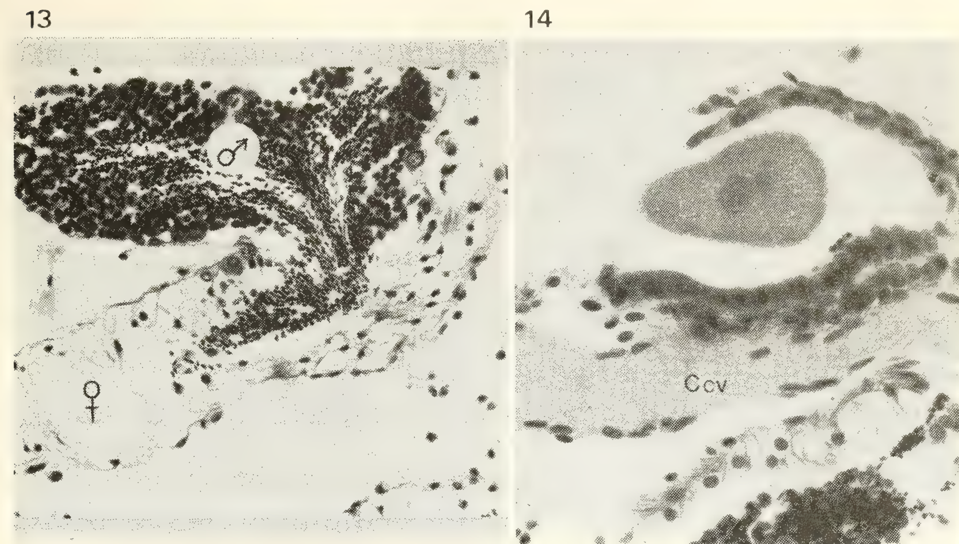


FIG. 13: *Acino masculino evacuando a través de un ducto femenino. 250 X.*

FIGS. 14: *Autofertilización. Segmentación en un ovocito en tránsito a través de la última porción del ducto principal. 400 X*

3.5. – Caracterización de los tipos celulares de la serie germinal.

a – Serie masculina

Espermatogonias: los elementos basales masculinos resultan fácilmente discernibles en gónadas recientemente recuperadas, en aquellas en las primeras etapas de multiplicación o, finalmente, en gónadas de ejemplares juveniles en las etapas iniciales de su desarrollo. De acuerdo a su talla y afinidades tintoriales es posible distinguir:

– *Espermatogonias troncales o primarias:* destacables por su gran talla, diámetro nuclear 8,5 a 10 μ, diámetro celular aprox. 15 μ, el núcleo encierra un par de nucleolos de 1 - 1,5 μ, material cromatinico granular. Es característica su débil basofilia. Se localizan en un solo estrato sobre la pared alveolar.

– *Espermatogonias secundarias:* se originan en la multiplicación de los elementos precedentemente descriptos, diferenciándose de ellos por su acentuada basofilia, citoplasma muy escaso, diámetro nuclear menor: 7 - 8 μ , poseen usualmente dos nucleolos.

Si bien no se puede esclarecer con certeza la presencia de las llamadas "células madres" de las gonias, se observaron ciertos elementos asimilables a ellas cuyas características resultan: su gran talla, mayor que las de las espermatogonias primarias; citoplas-

ma hialino; cromatina finamente granular; muy débil basofilia; aunque los límites celular y nuclear resultan bien definidos, a diferencia de o habitualmente descripto. Su número es escaso, permaneciendo ampliamente apoyadas sobre la pared alveolar.

Espermatocitos: a partir de la diferenciación de los elementos basales de la serie es posible distinguir:

– *Espermatocitos I:* caracterizados por las distintas imágenes nucleares correspondientes a diferentes etapas de la profase de la primera división meiótica. Su talla nuclear resulta levemente superior a la determinada para las gonias secundarias: 7,5 – 9 μ, citoplasma muy escaso.

– *Espermatocitos II:* su exacta identificación resulta dificultosa. Su talla nuclear sufre importante reducción respecto de los elementos en que se originan: 4 - 5 μ, material cromático condensado.

Espermátidas: de citoplasma extremadamente escaso, material cromático fuertemente condensado, su talla se reduce a 3 - 3,5 μ.

Espermatozooides: Las gametas maduras presentan una talla de 5,5 - 6 μ, cabeza en forma de tronco de cono.

b – **Serie femenina**

Ovogonias: como es descripto para la generalidad de los pelecípodos, los elementos basales de la serie germinal femenina resultan muy semejantes en sus características citológicas a los correspondientes de la serie masculina. En el caso de *N. limosa* su talla nuclear oscila entre 9 - 10 μ., poseen un sólo nucleolo, carácter señalado frecuentemente como el único elemento diferencial respecto de las espermatogonias.

Ovocitos: en su evolución es posible distinguir:

– *Ovocitos previtelogenéticos:* los fenómenos madurativos que han iniciado las ovogonias prosiguen hasta completarse la profase de la primera división meiótica. Alcanzado el estadío de diplonema la figura nuclear resulta caracterizada por varios acúmulos de material cromatínico de disposición perisférica sobre la cara interna de la membrana nuclear y rodeando al nucleolo. La talla nuclear correspondiente a este momento es de 13μ, el diámetro celular aproximado a 17 μ.

Hacia el final del estadío de previtelogénesis los ovocitos han logrado una talla de 24 a 30 μ.; el diámetro nuclear se incrementa a 17 - 20 μ. Es característica su amplia unión a la pared alveolar.

– *Ovocitos vitelogenéticos:* la característica saliente resulta el importante incremento en la talla celular debida a la progresiva acumulación de sustancias de reserva. Completado el proceso de vitelogénesis la talla ovular alcanza a 120 μ siendo el diámetro nuclear próximo a 60 μ. Durante esta etapa resulta peculiar la evolución del nucleolo, que a la par que manifiesta un importante aumento de talla, se diferencia en una o más zonas oscuras a modo de calotas o casquetes perisféricos en tanto que una o más formaciones vacuolares se desarrollan en su centro fuertemente eosinófilo.

3. 6. Ciclo reproductivo.

A partir del análisis histológico de 16 muestras que cubren un período de dieciocho meses –junio de 1980 a noviembre de 1981– se describe el ciclo gonadal de *Neocorbicula limosa* fraccionando la continuidad del fenómeno reproductivo en una serie de etapas –determinadas en base a caracteres microscópicos– para, finalmente, ubicar temporalmente tales eventos, componiendo un esquema claro del ciclo reproductivo de la especie en el área de estudio.

Es general en al descripción del ciclo gonadal anual de una especie, atender preferentemente a la evolución de la serie germinal femenina. En el caso de *N. limosa,* la falta de secuencias y/o delimitación neta de las etapas características de la ovogénesis –originada en la particular funcionalidad de la fracción femenina (sección 3.6.1.)– obliga a detallar la secuencia anual de los procesos gametogenéticos a partir de las transformaciones que se operan en los tejidos masculinos.

3.6.1. – Desarrollo y funcionalidad de la fracción femenina.

Los tejidos femeninos no muestran un nivel de actividad comparable a lo largo de su extensión. Los acinos que integran la zona periférica o cortical de esta porción glandular permanecen prácticamente inactivos en el transcurso del ciclo anual; no se detectan sino raros puntos de multiplicación gonial, manteniendo las características de la estructura alveolar descriptas para las fases primarias del desarrollo gonadal. (sección 3.2.).

La porción central del volumen ocupado por los tejidos femeninos es la que evoluciona aproximadamente dentro del esquema habitual en pelecípodos.

La zona "no funcional" se caracteriza sin embargo por la presencia constante aunque aislada de pequeños acúmulos de ovogonias –grupos de tres a seis células, por lo general– a nivel de la base de la pared alveolar; es asimismo habitual la ocurrencia de ovocitos previtelogenéticos o incluso en las primeras etapas de vitelogénesis; elementos que no evolucionarán según el proceso normal, siendo lógico suponer la existencia de un mecanismo de inhibición que actúe sobre su desarrollo, aunque no resulta posible determinar la naturaleza de tal regulación.

Dadas las características del desarrollo y funcionalidad que alcanza la fracción femenina, resulta sumamente difícil precisar la dinámica ovárica, especialmente al pretender encuadrar su evolución estacional en los esquemas generales descriptos para otros pelecípodos. La escasa extensión de los tejidos femeninos funcionales y la baja numerosidad de los elementos germinales en evolución dentro de cada alvéolo no permite este encuadre, que basa su secuencialización en la evaluación de el o los tipos celulares dominantes, grado de replesión de los acinos, etc.

Así la porción ovárica funcional no muestra una actividad estacional definida. A lo largo de un ciclo anual el estado de madurez evidenciado resulta compatible con lo descripto para otros bivalvos (Christiansen, 1971; Schuldt, 1975) como madurez incipiente o en algunos casos madurez avanzada. Los alvéolos contienen desde ovogonias hasta ovocitos previtelogenéticos y en curso de vitelogénesis, así como algunos pocos elementos maduros casi sin excepción durante todo el año. FIG. 15 - 16.

3.6.2. Evolución anual de los eventos reproductivos en la fracción masculina.

Se describen a continuación las etapas en la evolución de los tejidos gonadales masculinos, definibles microscópicamente a partir de la evaluación de las variaciones

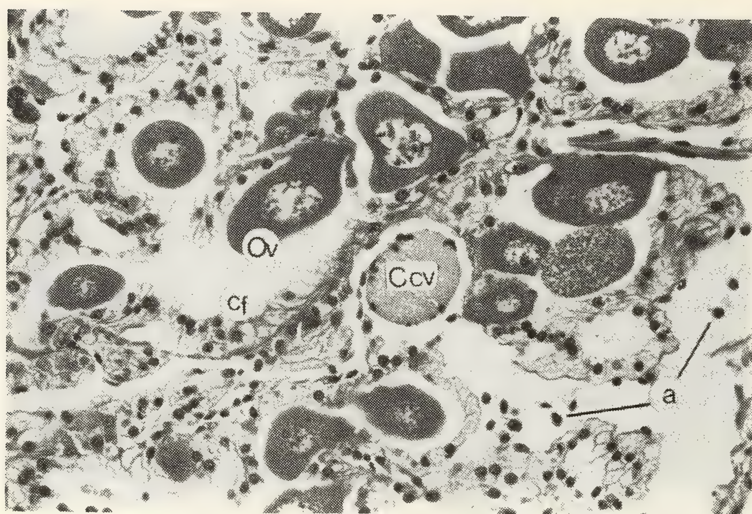


FIG. 15: *Zona funcional o "activa" de la fracción femenina. 250 X. cf. células foliculares; Ov. ovocito en vitelogénesis; a - elementos ameboides; C cv - conectivo cerebro-visceral.*

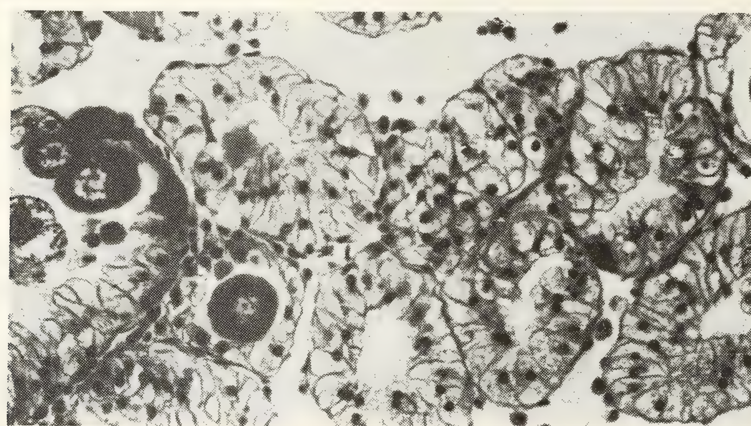


FIG. 16: *A la derecha "zona no funcinal". 250 X*

operadas en los tipos celulares y procesos dominantes en el epitelio seminal, y de las características del "tejido folicular" intra-alveolar; intentando en cada caso su asimilación a la escala de madurez sexual propuesta por Lubet (1959) para *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis,* a fin de destacar los desvíos observados en *Neocrobicula limosa* respecto de un ciclo reproductor que puede considerarse "tipo" para pelecípodos.

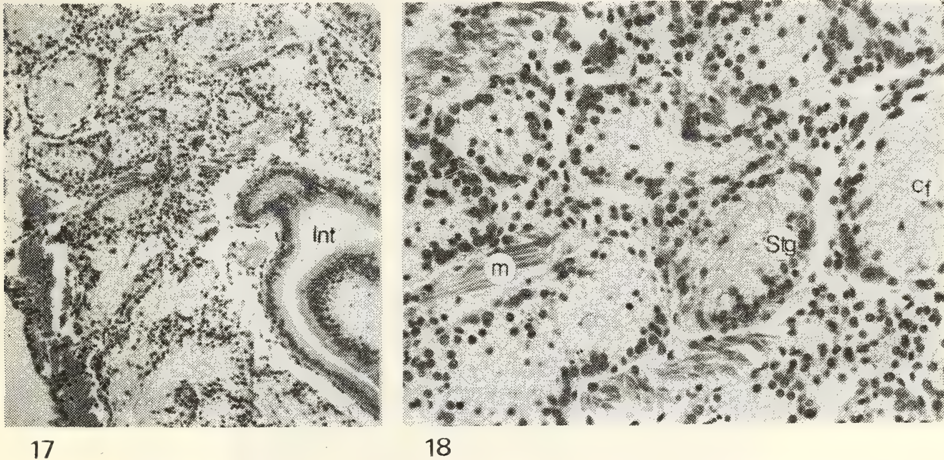
Se destaca el sincronismo poblacional en el desarrollo de los procesos sexuales evidenciado por la escasa o casi nula diversidad de "estadíos" en cada muestra mensual, las diferencias observadas son de grado.

Etapa de reposo sexual:

Corresponde a la culminación de la recomposición alveolar operada luego del período reproductivo anterior; que se evidencia en el amplio desarrollo que alcanzan los elementos foliculares ("células nutricias") intra-alveolares y la existencia de un estrato de espermatogonias primarias como únicos elementos de la serie germinal presentes. El rasgo saliente es la falta de activación de estas células basales.

El tejido conjuntivo inter-alveolar, dada su laxa organización y escaso desarrollo. no evidencia variaciones ponderables a lo largo del ciclo anual.

La etapa de reposo fue detectada en los meses de agosto de 1980 y 1981; coincide con lo descripto por Lubet (op. cit.) como Estadío 0: período de reposo sexual. Fig. 17 - 18.



FIGS. 17 - 18: *Fracción masculina. Etapa de reposo. Se nota el desarrollo de las células foliculares, y el estrato gonial basal inactivo. Fig. 17: 100 X; Fig. 18: 250 X. Stg. - espermatogonias; cf. - células foliculares; Int. - Intestino; m. - fascículos musculares.*

Etapa de multiplicación gonial:

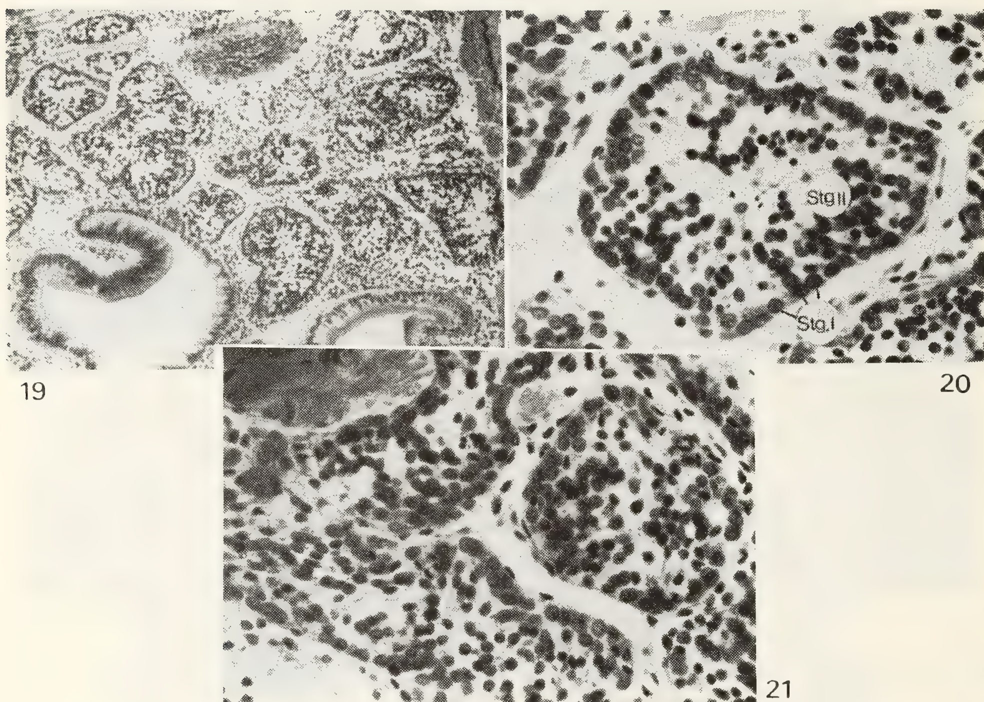
Característica de este momento del ciclo reproductivo resultan los procesos mitóticos que involucran a las espermatogonias primarias y secundarias (éstas últimas, originadas en la división de los elementos precedentes), con lo que se inicia la formacion del epitelio seminal.

En algunos individuos, en los que la etapa se encuentra más avanzada —o en ciertos acinos de la masa gonadal— es posible detectar ya la presencia de espermatocitos I, aunque en escaso número.

Los tipos celulares dominantes son los elementos basales de la serie germinal: espermatogonias primarias y secundarias.

El epitelio intra-folicular conserva importante desarrollo.

La caracterización efectuada corresponde a las muestras 3 y 14 de los meses de setiembre de 1980/81; no discrepando con lo descripto por Lubet como Estadío I: multiplicación de gonias. Fig. 19 - 21.



FIGS. 19 (100 X) - 20 - 21 (400 X): *Etapa de multiplicación gonial. Stg. I - espermatogonias primarias; Stg. II - espermatogonias secundarias.*

Etapa de espermatogénesis:

El fenómeno dominante resulta la *diferenciación* de los distintos tipos celulares que componen el epitelio seminal, sobre el cual ya es posible identificar la totalidad de sus elementos, con marcada dominancia del estrato de espermatocitos I.

Se destacan particularmente las figuras nucleares que corresponden a la profase de la primera división meiótica que caracterizan a los espermatocitos I. Fig. 22.

Las espermatogonias son aún abundantes, formando un estrato basal que delínea el contorno alveolar. Continúa su actividad de multiplicación.

Los fenómenos de gametogénesis descriptos se desarrollan durante el mes de octubre.

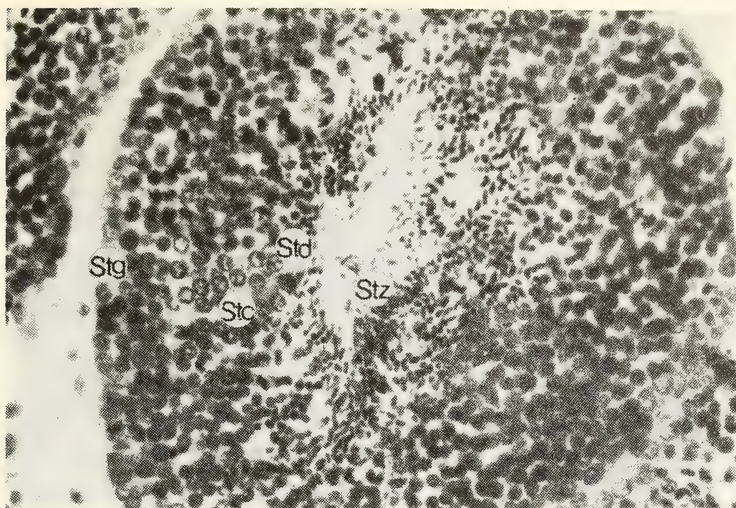


FIG. 22: *Etapa de espermatogénesis, caracterizada por la dominancia del estrato correspondientes a espermatocitos I. 400 X. Nótense las imágenes nucleares que evidencian la profase de la primer división meiótica. Stg. - espermatogonias; Stc. - espermatocitos; Std. - espermátidas; Stz. - espermatozooides.*

Observaciones:

A partir de esta etapa es que se marca la divergencia respecto del "ciclo tipo"; ya que los primeros elementos maduros –escasos en número– que se presentan en los ejemplares más adelantados inician una emisión temprana caracterizada por la presencia en el volúmen evauado de alto número de elementos inmaduros –especialmente espermatocitos I–. Fig. 12.

La presencia de los primeros elementos maduros que desencadenan los fenómenos de emisión, impiden que la espermiogénesis, que recién se inicia, progrese hasta la base del epitelio por lo que no resultará posible definir claramente un estadío de madurez total (asimilable al Estadio III A_2 de Lubet) que preceda a la evacuación.

Etapa de maduración:

Durante el desarrollo de esta etapa se profundizan los procesos de *diferenciación* –es manifiesto un alto nivel de actividad meiótica observable a nivel del estrato de espermatocitos– y de maduración –actividad de espermiogénesis– resultando éstos últimos los de mayor peso. Los tipos celulares dominantes son espermatocitos II, espermátidas y espermatozooides; aunque aún es importante el número de espermatocitos I en evolución. Fig. 23.

Se acentúa la emisión gamética, aunque no resulta posible la caracterizacón del momento como una evacuación parcial debido a la manifiesta actividad del epitelio seminífero.

Los integrantes de las muestras de noviembre y principio de diciembre de 1980/81 evidencian las características descriptas.

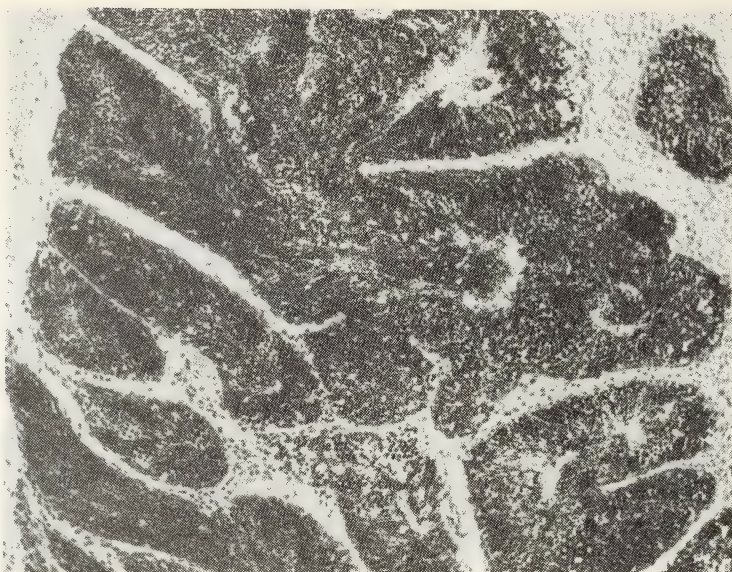


FIG. 23: *Etapa de maduración. Los fenómenos de espermiogénesis progresan hacia la base alveolar, numerosos espermatozooides ocupan la luz alveolar.*

Correspondería su encuadre dentro de los Estadíos III A_1 y III A_2 de la escala de referencia, sin embargo la ocurrencia de emisiones progresivas como fenómeno corriente introduce una variable atípica que impide tal intento.

Etapa de evacuación:

Las distintas fases de la emisión gamética que incluyen los momentos de evacuación parcial y total, son diminantes. Hacia el final de la etapa es característica la presencia de espermatozooides residuales, así como de grupos de pocos espermatocitos que seguramente no completarán su desarrollo. Sobre la pared alveolar persiste un estrato discontínuo de espermatogonias a partir del cual se recompondrá el epitelio germiminal. A pesar del vaciamiento total no se observa retraimiento importante de las paredes de los acinos. Fig. 24 - 26.

Adquieren importancia en este momento los fenómenos de reabsorción, que involucran principalmente a los espermatocitos remanentes y no en igual grado a espermatozooides. Fig. 26.

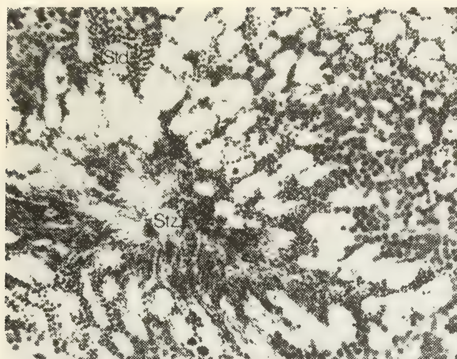
La descripción corresponde a lo observado entre fin de diciembre y final de enero '81; resultando compatible con la caracterización de Lubet para el Estadío III B.

Etapa de restauración gonadal.

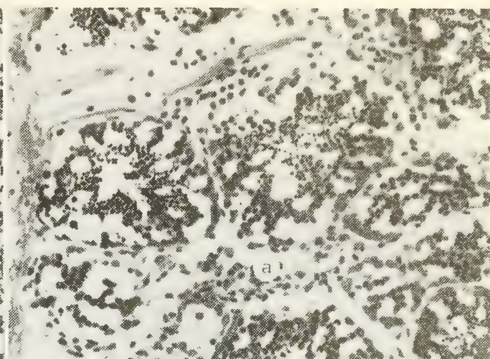
Incluye la restauración del epitelio de células foliculares intra-alveolares y la recomposición del epitelio germinal a partir de los grupos de espermatogonias remanentes del ciclo anterior. Fig. 27 - 28.

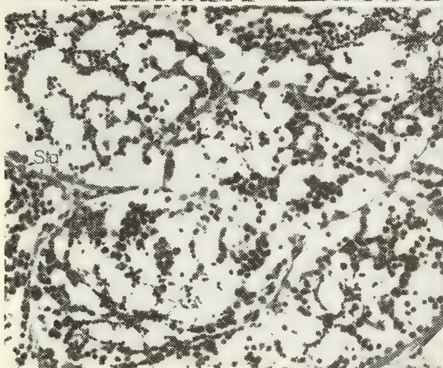
Resulta destacable la rapidez con que evolucionan los procesos de recuperación entre dos emisiones dentro de un ciclo anual, la que logra completarse en el curso de un

24

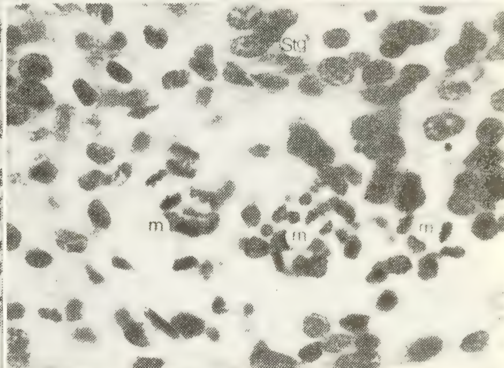


25

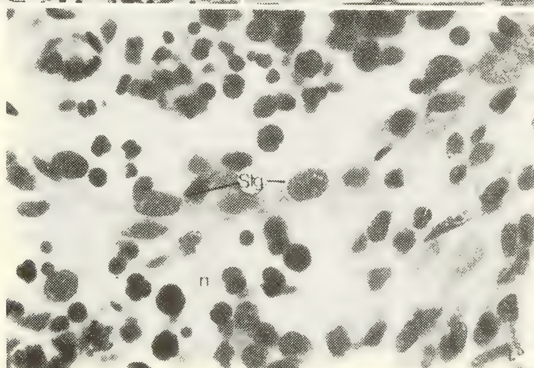




26



27



28

FIGS. 24 - 26 (250 X) *Tres fases en la Etapa de evacuación.*

24 - 25 *Evacuación parcial, aún son activos los últimos procesos de maduración sobres epermatocitos (Stc) y espermátidas (Std). a. - cúmulo de fagocitos.*

26 –*Evacuación total., restan espermatozooides (Stz) residuales y espermatocitos (Stc) que serán reabsorvidos. Stg. - espermatogonias a partir de las que se operará la recuperación.*

FIGS. 27 - 28 (1000 x) *Etapa de restauración. Numerosas figuras de mitosis (m) evidencian la activa multiplicación de espermatogonias (Stg) que recompondrán el epitelio seminal. - n - necrobiosis de elementos remanentes del ciclo anterior.*

mes –fue detectada en febrero de 1981– Corresponde su asimilación al Estadío III C de la escala de madurez propuesta por Lubet.

Resulta éste un momento de gran complejidad, ya que coexiste en un mismo alvéolo importantes contingentes de elementos residuales –numerosas figuras de reabsorción que afectan particularmente a espermatocitos– con fenómenos de recuperación que se desarrollan a nivel de la base alveolar –multiplicación gonial– que resultan así parcialmente enmascarados. Fig. 29.

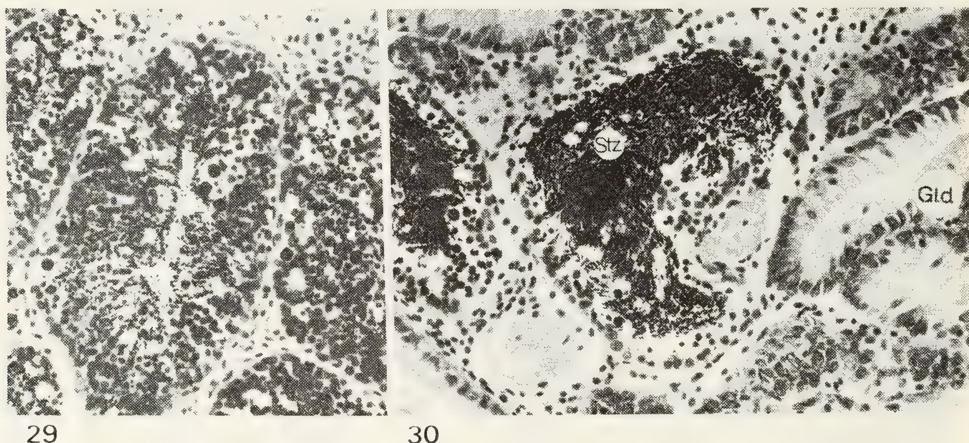


FIG. 29 (250 X) *Completada la restauración, es activa la diferenciación de los tipos celulares de la serie masculina.*

FIG. 30: *Etapa de maduracón, posterior a la restauración. 250 X*

Ultima emisión de un ciclo anual:

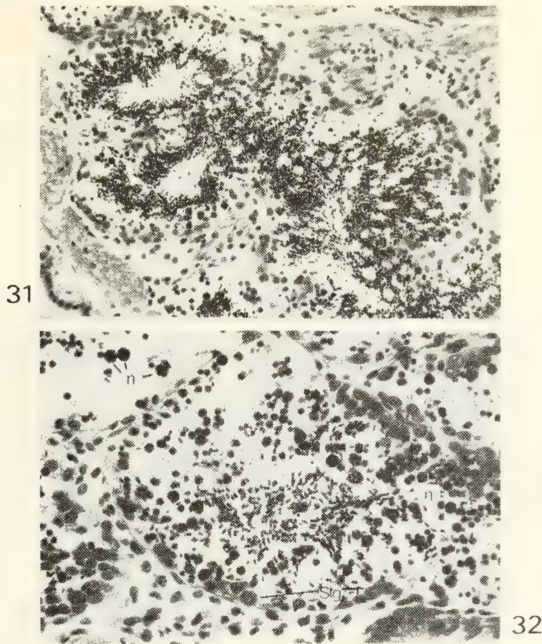
Es la evacuación gamética que precede a las etapas de reversión y reposo sexual, con la que finaliza un ciclo gonadal anual. Corresponde al estadío III D descripto por Lubet, y tiene lugar durante los meses de marzo y abril, luego de la rápida recuperación operada en febrero.

El último "pulso" madurativo prácticamente agota el estrato de espermatocitos, sin embargo la evacuación no alcanza a vaciar totalmente los alvéolos masculinos, siendo significativo el número de gametas maduras residuales que persistirán a través de la etapa posterior. Un estrato casi contínuo de espermatogonias permanece inalterable sobre la pared alveolar. El epitelio folicular, visiblemente reducido. Fig. 31 - 32.

Etapa de reversión gonadal:

Los fenómenos de reversión se desarrollan en forma progresiva –a través de los meses de mayo - junio - julio– hasta completarse habiendo alcanzado una configuración próxima al reposo sexual.

Se trata de la reorganizacón del epitelio de células "nutricias o foliculares" intraalveolares cuyo desarrollo paulatino tiene lugar desde la base hacia el centro de los acinos.



FIG' 31: *Ultima emisión gamética del ciclo anual; fase inicial. Se observa la persistencia de un estrato de espermatogonias, y el desarrollo de células foliculares que desplazan las gametas maduras hacia la luz. (250 X).*

FIG. 32: *Ultima emisión; fase final. Restan elementos maduros residuales, son numerosas las imágenes de reabsorción (n) que afectan principalmente a los elementos inmaduros. (400 X)*

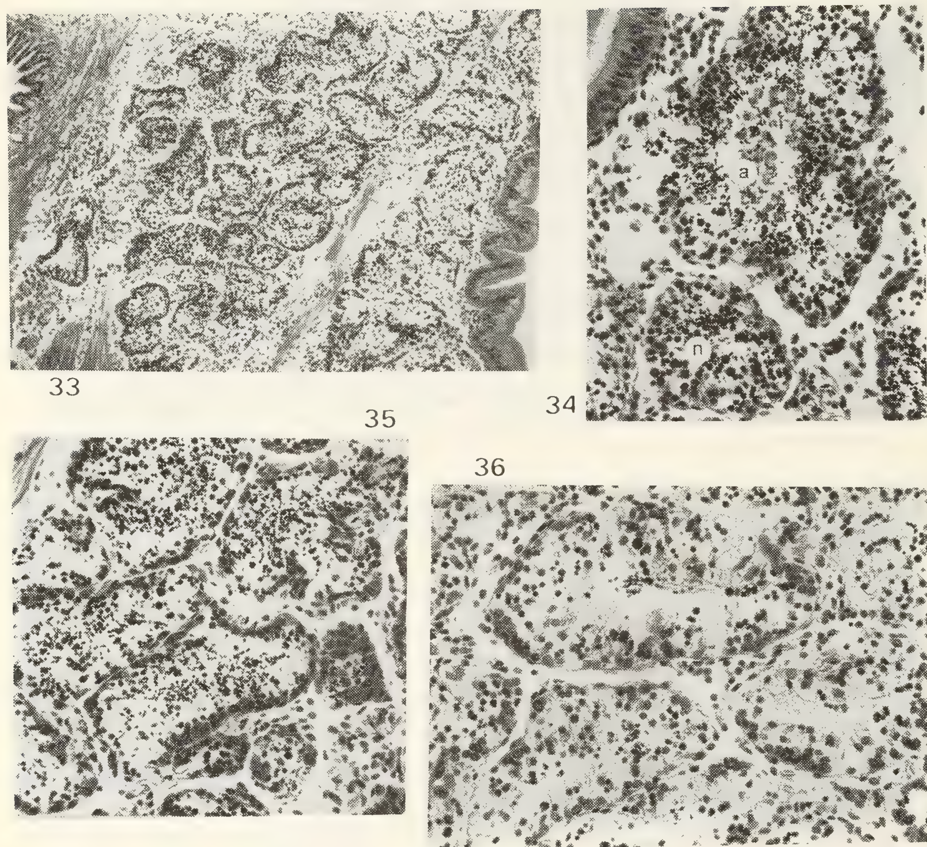
Es definitorio, además, la falta de actividad a nivel de las espermatogonias primarias, que en un estrato contínuo ocupan la base alveolar. Fig. 33 - 36.

Simultáneamente con la reversión folicular, tiene lugar la progresiva eliminación —por emisión y/o reabsorción— de los elementos germinales maduros que en importante número oucpan la luz de los acinos en las primeras fases del proceso. La necrobiosis alcanza niveles relevantes en el período junio-julio. Fig. 34-35. Resulta esta etapa de reversión gonadal, de características atípicas dada la coexistencia de fenómenos de restauración con la eliminación de elementos residuales.

Recapitulando lo observado a nivel de los tejidos gonadales masculinos, y asumiendo que tales eventos pueden ser tomados como parámetros ciertos de la actividad reproductiva anual de la especie; se puede precisar la existencia de un pico de máxima actividad de emisión gamética en el período: fin de diciembre —enero y, luego de una rápida recuperación gonadal que tiene lugar en febrero, un segundo momento en marzo-abril. Sin embargo la eliminación de gametas masculinas al medio se extiende en forma continuada entre octubre y mayo. La extensión que ocupa el período de expulsión pareciera responder a las particularidades del desarrollo y funcionalidad de la fracción femenina. Los momentos de evacuación mencionados resultan acordes con los períodos de reclutamiento de embriones a nivel branquial.

Un período de reposo sexual —entendiendo por tal la no actividad del estrato basal, recompuesto *"a posteriori"* de las últimas emisiones, ya que continúa la expulsión y reabsorción de elementos maduros— se extiende entre mayo y agosto (la Etapa de reposo caracterizada se desarrolla en este último mes).

El mes de setiembre está signado como el momento clave de la multiplicación gonial en el inicio de un nuevo ciclo.



FIGS. 33 - 36: *Fases de la reversión gonadal.*

33: *Vista general del inicio de la etapa, un estrato contínuo de espermatogonias delínea el controno alveolar. 100 X*

34 - 35: *Progresiva reconstitución de los elementos foliculares y eliminación de los últimos espermatozooides residuales, numerosos fagocitos (a) en la luz y figuras resultantes de su actividad. 250 X*

36: *Fase próxima al final de la reversión. 400 X*

3.7. Procesos necrobióticos.

Los tipos celulares que intervienen en los procesos necrobióticos –amebocitos, fagocitos, etc. según los autores– se caracterizan por presentar un citoplasma claro, débilmente colorable; núcleo fuertemente basófilo, esférico u oval (talla nuclear 6-7 μ.) de posición usualmente excéntrica; diámetro celular variable, 10-14 μ es el promedio.

Esta única categoría de elemento fagocitario observada es asimilable a los "amebocitos hialinos" descriptos por diversos autores: Lubet, 1959; Lucas, 1965; Vinuesa, 1981; entre otros.

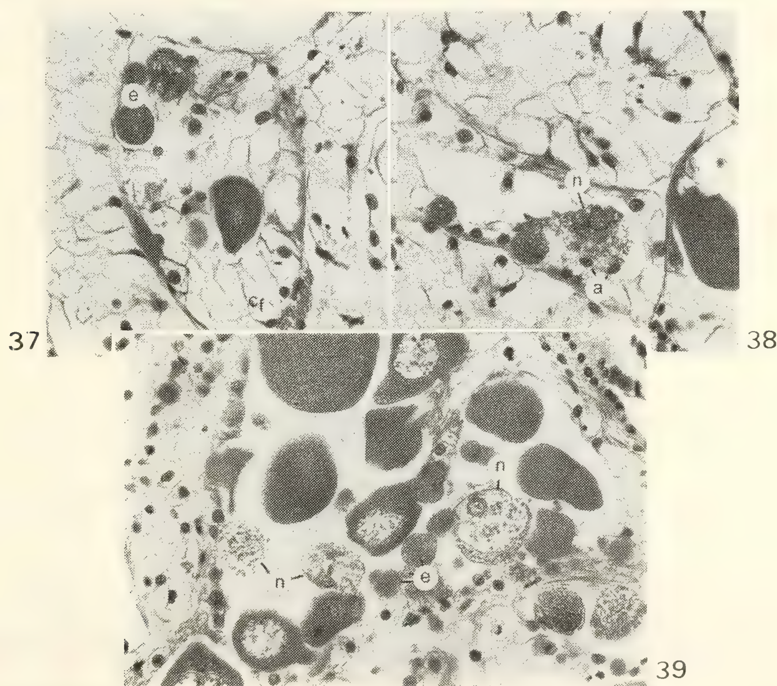
Su presencia constante y en elevado número es característica de la gónada de *Neocorbicula limosa* tanto en su porción masculina como en la femenina. En su localización extra-alveolar –en el conjuntivo circundante– su numerosidad resulta elevada a lo largo de todo el año.

Los procesos de reabsorción alcanzan en determinados momentos del ciclo reproductor –especialmente en las etapas posteriores a la evacuación– importante extensión. Su ocurrencia reviste capital importancia en la eliminación de elementos residuales de cada ciclo gametogenético, especialmente numerosos en la fracción masculina, para dar lugar a la remodelación alveolar.

Como se ha descripto (Christiansen & Brodsky, 1971) es posible en principio discernir dos modalidades en los fenómenos reabsortivos:

a. – Reabsorción directa

Observable sólo en los elementos de la fracción gonadal femenina. Se trata de una autólisis de ovocitos maduros o en vías de vitelogénesis; caracterizada por la vacuolización del coplasma, desintegración nucelar y nucleolar. Fig. 37 - 39.



FIGS. 37 - 39 *Necrobiosis en la fracción femenina.*
n. - ovocitos en necrosis; a. - amebocitos; e. - esférulas eosinófilas; cf. - células foliculares. 400 X

Acompañando a este proceso se presentan una serie de cuerpos eosinófilos, esféricos, de talla variable, cuya vía de orígen no es clara aunque sin duda son producto de la reabsorción. Estas figuras son asimilables a los "cuerpos proteicos" mencionados por Christiansen (1971) en gónadas de *Mesodesma mactroides* en evacuación parcial, asignándole igual significación; igualmente, ciertas "masas eosinófilas" son reportadas por Vinuesa & Tortorelli (1980) para *Aulacomya ater.*

Frecuentemente se observan fagocitos que intervienen en la eliminación de los restos del proceso. Fig. 38. Si bien es general la consideración de la reabsorción directa como un proceso definido, en *N. limosa* al menos, parece ser sólo una etapa que antecede a la "reacción" de los elementos fagocitarios que intervienen en la llamada reabsorción reaccional.

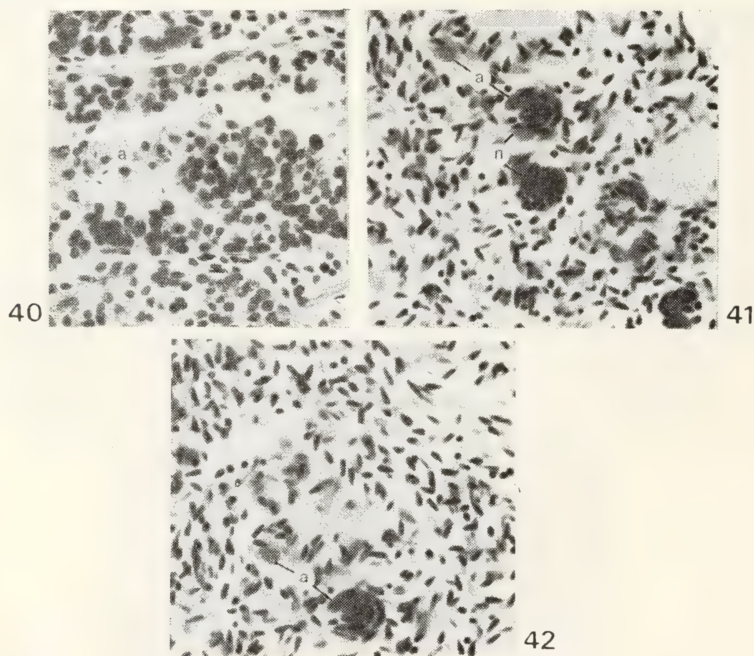
La mayor incidencia de los procesos de reabsorción sobre los tejidos femeninos se anotó durante los meses de enero a marzo.

b. – **Reabsorción reaccional.**

Fenómeno originado por la presencia de elementos sexuales remanentes luego de una evacuación, la que determina el ingreso de células fagocitarias al interior de los alvéolos que intervienen en su eliminación.

La reabsorción reaccional es particularmente evidente en la fracción masculina. Luego de la invasión de los acinos por parte de los amebocitos se observan distintas figuras que corresponden a diferentes momentos del proceso. Fig. 40 - 42.

Dentro del ciclo gonadal anual, las primeras imágenes resultantes de la reabsorción reaccional sobre los tejidos masculinos se detectan a partir de diciembre, profun-



FIGS. 40 - 42: *Necrobiosis en la fracción masculina.*

40 y 41 *reabsorción durante la primera fase de la reversión, eliminando los numerosos espermatozooides residuales. 1000 X.*

42 *reabsorción reaccional en la etapa de restauración gonadal entre dos emisiones; se destaca la invasión de un acino por elementos ameboides (a). 400 X*

n. - grupos de espermatozooides en reabsorción, nótense los núcleos de los fagocitos entre ellos.

dizándose durante el mes de enero, para alcanzar su máxima expresión en febrero (posterior a la emisión de enero). Su desarrollo continúa a través de marzo, abril y mayo. Dentro del período señalado los procesos necrobióticos comprenden casi exclusivamente a elementos inmaduros –especialmente espermatocitos– La figura microscópica es característica: dos, cuatro o más cuerpos esféricos marcadamente basófilos se observan contenidos en una membrana común. Fig. 28.

A partir de junio y durante julio, la necrobiosis se extiende principalmente a las células sexuales maduras residuales, que en importante número ocupan la luz alveolar Fig. 40 y 42.

CONCLUSIONES:

– La gónada de *Neocorbicula limosa* (Maton) es una glándula hermafrodita de tipo funcional.

– Las fracciones genitales correspondientes a cada sexo poseen localizaciones definidas en el volumen visceral; los tejidos espermáticos –que superan a los ováricos en su extensión– se desarrollan ventralmente, en tanto que los tejidos femeninos se ubican en la mitad superior de la gónada.

– Ya en individuos de 7 mm. de longitud ambas fracciones genitales se encuentran perfectamente definidas.

– En la estructura alveolar correspondiente a las fases primarias del desarrollo gonadal las "células foliculares" o "nutricias" resultan los elementos dominantes en la pared alveolar.

– El tejido conjuntivo interalveolar es escaso, con numerosos elementos ameboides y no manifiesta variaciones estacionales ponderables en su desarrollo y/o composición.

– Como raras excepciones a la neta segregación espacial de los tejidos masculinos y femeninos, se describen casos de hermafroditismo intra-alveolar o acinos mixtos en los que elementos femeninos se desarrollan en alvéolos de filiación definidamente masculina.

– La falta de secuencia y/o delimitación neta de las etapas características de la ovogénesis –originada en la particular funcionalidad de la fracción femenina– obliga a detallar la secuencia anual de los fenómenos gametogenéticos a partir de las transformaciones que se operan en los tejidos masculinos.

– Los tejidos femeninos no muestran un nivel de actividad uniforme a lo largo de su extensión. Los acinos que integran la zona perisférica o cortical permanecen inactivos en el curso del ciclo anual. La porción central evoluciona dentro del esquema habitual en pelecípodos a excepción del escaso número de ovas en desarrollo.

– En la evolución anual de los eventos reproductivos en la fracción masculina se describen las etapas de: reposo sexual - multiplicación gonial - espermatogénesis - maduración - evacuación - restauración gonadal - última emisión de un ciclo anual - reversión.

La ubicación temporal de las etapas definidas resulta en la composición del ciclo reproductivo anual, que se resume: un pico de máxima actividad de emisión gamética tiene lugar en el período: fin de diciembre-enero, y, luego de una rápida recuperación gonadal que se opera en febrero, un segundo momento en marzo - abril. La reversión gonadal se desarrolla entre mayo y julio, alcanzándose en el mes de agosto la etapa de reposo sexual. El mes de setiembre está signado como el momento clave de la multiplicación gonial en el inicio de un nuevo ciclo.

– Una característica de la gametogénesis masculina resulta de la ocurrencia de emisiones tempranas que incluyen a los primeros elementos maduros del proceso, impidiendo que la diferenciación y maduración de los diferentes tipos celulares se complete para definir un estado de madurez total previo al inicio de la evacuación.

– Se describen los procesos necrobióticos que tienen lugar sobre los tejidos gonadales, especialmente en los momentos de post-puesta.

BIBLIOGRAFIA

BARAIBAR, B.C. 1959. Estudio sobre *Corbicula limosa* Maton. ***Actas y Trabajos. Primer Congreso Sudamericano de Zoología.*** T. II, Sec. 3: 3-13. La Plata. Argentina.

CHRISTIANSEN, H.E. 1971. Reproducción en Olivier, S.R. (ed.). Estructura de la comunidad, dinámica de la población y biología de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides* Desh.) en Mar Azul (Ptido. de Gral. Madariaga, Bs. As. Argentina). ***Proyecto de Desarrollo Pesquero F.A.O.***, 27: 37-47.

– y S. BRODSKY. 1971. Procesos necrobióticos en gónadas de organismos marinos. ***Res. Com. V Congreso Latinoamericano de Zoología,*** 18-23 octubre de 1971. Uruguay.

COE, W. R. 1943. Sexual diferentiation in Mollusks. I Pelecypods. ***Quart. Rev. Biol. U.S.A.***, 18: 154-164.

– 1943 b. Development of the primary gonads and diferentiation of sexuality in *Teredo navalis* and other Pelecypods Mollusks. ***Biological Bulletin***, 84(2): 178 - 186.

DALL, W.H. 1902. Note on *Neocrobicula* Fischer. ***Nautilus,*** 16:82-83.

ITUARTE, C.F. 1981. Primera noticia acerca de la introducción de pelecípodos asiáticos en el área rioplatense. ***Neotropica,*** 27 (77): 79 - 82.

– 1982. El fenómeno de incubación branquial en *Neocrobicula limosa* (Maton) 1809. (Mollusca Pelecypoda). ***Neotropica,*** (en prensa).

LUCAS, A. 1965. Recherche sur la sexualité des mollusques bivalves. ***Bull. Biol. Fr. et Belgique,*** 99: 115-247.

LUBET, P. 1959. Recherches sur le cicle sexual et l'emission des gametes chez les Mytilidés et les Pectinidés. ***Rev. Trav. Inst. Péches Marit.***, 23: 387-548.

MARSHALL, W.B. 1924. New Uruguayan Mollusks of the genus *Corbicula*. ***Proc. U.S. National Museum,*** 66(15): 1-12, pl. 1 y 2.

– 1927. New species of Mollusks of the genus *Gorbicula* from Uruguay and Brazil. ***Ibid.*** 72(1): 1-7, p. 1.

PARODIZ, J. J. 1977. Mollusca. En: Hurlbert, S.H. (ed.). Biota acuática de Sudámerica Austral. San Diego State Univ. San Diego, California; Pags. 320 - 329.

– & L. HENNINGS. 1965. The *Neocorbicula* (Moll. Pel.) of the Paraná - Uruguay basin, South América. ***Annals Carnegie Mus.*** 38(3): 69 - 96.

RAVEN, C.P. 1958. Morphogénesis: the analysis of Molluscan development. Pergamon Press. Inc., New York. 311 pags.

SASTRY, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: Reproduction of Marine Invertebrates. Vol V. Mollusks. Giesse, A.C. & J.S. PEARSE (eds.). Academic Press Inc., New York. pags. 113-292.

SCHULDT, M. 1975. Consideraciones sobre la reproducción de los pelecípodos Chionidos en la cholguera de Punta Loma, golfo Nuevo. Chubut. ***Physis,*** secc. A., 34 (88): 137-146.

VINUESA, J.H. 1981. El ciclo sexual del mejillín patagónico *Brachiodontes purpuratus* (Lamark) en Puerto Deseado. ***Physis,*** secc. A. 38(97): 1-10.

– & M. del C. TORTORELLI. 1980. Ciclo sexual de la cholga *Aulacomya ater* Molina en Puerto Deseado. ***Physis,*** secc. A, 39 (96): 21-32.

WOODS, F. H. 1931. History of the germ cells in *Sphaerium striatinum* (Lam.) ***Journal of Morphology,*** 51: 545-595.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado siendo el autor Becario de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por lo que agradece el apoyo recibido.

Igualmente quede expresado el reconocimiento a la Dra. Zulma J. A. de Castellanos y al Dr. Miguel Schuldt por su invalorable aporte.

ISSN 0037-8437

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGIA DE *OCTOPUS TEHUELCHUS* D'ORBIGNY (MOLLUSCA: CEPHALOPODA)"

María Alejandra Pujals

RESUMEN

El estudio de observaciones realizadas sobre poblaciones de **O.tehuelchus** provenientes de Bal.San Matías (Pcia. de Río Negro, Argentina) permiten conocer aspectos de su biología reproductiva.

Los principales temas abordados son:

– El estudio de la anatomía e histología de la gónada y glándulas anexas de ambos sexos, caracterizándose la evolución de la serie gonial de las hembras a través de seis tipos ovocitarios, y para los machos, el rango de tallas donde se produce la primera maduración.

– A partir de las variaciones mensuales del Indice de Madurez y Gonadal se determina la secuencia anual de los fenómenos reproductivos a nivel poblacional. Se establece una escala de Madurez de cinco estadios para las hembras y de dos estadíos para los machos.

– Se determinan los períodos de desarrollo gonadal, maduración y desove, estableciéndose también la razón sexual.

SUMMARY

Various studies on **O.tehuelchus** populations have allowed us to understand some aspects of their reproductive biology.

The principal phaces analyzed are:

– Anatomical and histological study of the gonad and glands in both sexes with a definition of the gonial series (covering 6 ovocitary types) and the males growth rates under which the first maturation occurs.

– Annual secuence of the reproductive phenomena taking into account mounthly variations in the maturity and gonadal Indexes.

– Determination of the gonadal maturity and spawning periods, as well as sex-ratio.

1. INTRODUCCION

El pulpo costero **Octopus tehuelchus** D'Orbigny (1835) es una forma de pequeña talla que se distribuye desde el sur de Brasil hasta los 42°43' de Latitud Sur –Golfo Nuevo, Pcia. de Río Negro– (Carcelles, 1944; Castellanos, 1969).

Esta especie constituye un componente importante dentro del espectro de la pesca comercial regional de la provincia de Río Negro, cuyo centro se localiza en Puerto San Antonio Oeste.

La obtención del recurso es artesanal. Los "pulperos" recorren el amplio mesolitoral descubierto durante las bajamares provistos de un gancho de hierro de extremo aguzado y recurvado a modo de anzuelo con el cual prenden al pulpo por el saco visceral, retirándolo de su escondite bajo las piedras o cuevas.

Los niveles máximos de la actividad extractiva se registran durante el período diciembre-marzo de cada año, pudiendo extenderse en más y en menos un mes de acuerdo a las condiciones climáticas.

Durante los meses invernales la pesca del pulpo es prácticamente nula debido al clima riguroso de la zona, que provoca el desplazamiento en profundidad del pulpo y consecuentemente la retracción del interés de los "pulperos".

Asimismo, la distancia que separa la ciudad de San Anotnio de los centros donde el rendimiento de la pesca es máximo, insume gastos que no se justifican, para esta época del año, cuando el caudal de extracción es mínimo.

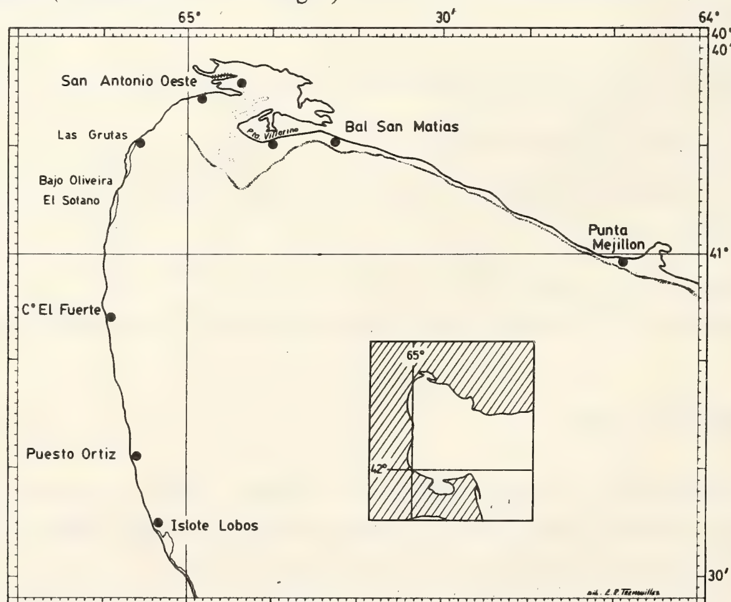
Los meses de mayor captura coinciden con el períoso de desarrollo y maduración gonadal de la especie. Dado que una medida proteccionista directa –es decir, la veda generalizada durante la época de reproducción– implica eliminar prácticamente la explotación del recurso; una legislación en tal sentido debiera contemplar la posibilidad de establecer una "veda rotativa" por zona.

Los antecedentes biológicos referidos a la biología de **Octopus tehuelchus** resultan escasos. Algunos aspectos aislados son referidos como datos complementarios en publicaciones de corte sistemático: Castellanos & Menni (1969) y Castellanos (1970) describen ciertas características de las oviposturas y del desarrollo embionario, así como una breve reseña de la morfología gonadal y espermatofórica. Pujals (1978) brinda una detallada descripción de la microanatomía del espermatóforo de esta especie.

La presente contribución da a conocer una serie de aspectos que hacen a la biología general y en especial a la ecología reproductiva del más relevante, sin dudas, de los pulpos de importancia económica de nuestro país.

2. AREA DE ESTUDIO – HABITAT DE LA ESPECIE

El material de estudio proviene del paraje conocido como Baliza San Matías, situado en el golfo San Matías (Provincia de Río Negro) a 70 km. de la localidad de San Antonio Oeste. Lámina 1.



LAMINA 1
Area de Muestreo

Otros sitios de colecta, dentro del área del golfo son: Punta Mejillón, Punta Villarino, Puerto San Antonio, Los Molinos, Las Grutas Cerro El Fuerte y Puesto Ortiz; como se indica en el mapa adjunto.

Las recolecciones se efectuaron sobre el extenso mesolitoral que descubren las bajamares de sicigia.

La zona intercotidal de Bal. San Matías presenta la clásica configuración de restinga patagónica, con innumerables pozas de marea y pequeños canales; que constituyen un ambiente físico especialmente apto para el asentamiento de las poblaciones de **O. tehuelchus.**

La temperatura del agua durante el verano oscila entre 18ºC y 22ºC, y en invierno entre 7ºC y 8ºC –valores mensuales promedio obtenidos en base a cuatro mediciones diarias (datos tomados en Pta. Delgado en el período: 3-78/2-79 por ALPTA, Alcalis de la Patagonia, y remitidas a Prefectura Naval de San Antonio Oeste).

Los pulpos permanecen durante las horas de bajante ocupando las oquedades y espacios existentes entre las rocas, pequeñas cuevas debajo de las piedras; etc., siendo común su localización dentro de conchas vacías de moluscos evidenciando un peculiar comportamiento criptozoico. Así, a fin de disimular su presencia, adhieren pequeños rodados y trozos de conchillas a las ventosas de los brazos que mantienen replegados sobre el manto.

Los accesos a sus guaridas se encuentran generalmente cubiertos por valvas de mejillín **(Brachydontes rodriguezi).**

3. MATERIAL Y TECNICAS

Dado lo fraccionario del muestreo durante el año 1978 –debido a causas técnicas y económicas– se consideraron dos períodos sucesivos: marzo1977 / marzo 1978 y diciembre 1978 / diciembre 1979, realizándose doce colectas de material en el paraje Baliza San Matías. Los viajes se proyectaron en coincidencia con los bajamares máximas a fin de facilitar la recolección de las muestras.

La extracción de las mismas se efectuó manualmente o con ganchos especiales siendo practicada por los "pulperos" de la zona dedicados a la pesca comercial y/o personalmente.

La totalidad del material se procesó fresco en el área de pesca tomándose las medidas de longitud que se detallan en 4,1., por medio de un compás de puntas secas y calibre de precisión a la décima de milímetro.

De cada muestra se tomaron submuestras representativas destinadas al estudio del ciclo reproductor, disecándose "in vivo" un número variable de gónadas de ambos sexos que se fijaron de inmediato en los líquidos fijadores: Carnoy, Helly, Zenker y formol para su posterior tratamiento histológico.

Los ejemplares sobre los que se efectuó la determinación de Indices gonadales y de madurez se fijaron en formol diluido al 10% en agua dulce sin tratamientos especiales, obteniéndose las medidas de peso post-fijación con una balanza de precisión a la centécima de gramo, previo un lapso adecuado y standart de escurrimiento sobre papel de filtro.

Los fijadores mercuriales: Zenker y Helly dieron resultados poco satisfactorios, especialmente en el caso de gónadas con ovas en avanzado estado de vitelogénesis.

El material procesado según se detalla, se sometió a técnicas histológicas habituales: inclusión en Parafina, cortes y tinción con Hematoxilina de Harris o Mayer – Eosina.

4. CARACTERESMORFOMETRICOS DE LA ESPECIE

4.1. Parámetros bioestadísticos

Se toma como referencia los índices y mediciones definidas por Robson (1929); Pickford (1945) y los empleados por Mangold Wirz (1963) para los octopodos del mar Catalán.

Se seleccionaron los parámetros que se consideraron más apropiados para definir en forma práctica la morfometría de la especie, sin abundar en series de mediciones cuyo real va-

lor a tal fin es dudoso, máxime cuando la mayoría de los casos son determinados sobre material fijado sin una metodología standart que permita realizar comparaciones válidas.

Así las mediciones de longitud se redujeron a: Longitud dorsal del manto (LM); Ancho del manto (AM); Ancho de la cabeza (AC); Longitud de la Lígula (LL) y Longitud del Calamus (LC).

Todas las determinaciones se efectuaron sobre material "fresco" pocas horas después de su extracción, y según el concepto que se detalla a continuación –que es el seguido por los teutólogos–.

– Longitud dorsal del manto (LM): medida en línea recta y perpendicular desde la línea imaginaria que une los ojos hasta el ápice del manto.

– Ancho del manto (AM): medida del ancho máximo del saco del manto.

– Ancho de la cabeza (AC): máxima distancia tomada a nivel de una línea interocular imaginaria.

– Longitud de la lígula (LL): tomada desde el margen de la última ventosa del ectocotilo hasta el extremo distal de la lígula.

– Longitud del calamus (LC): tomada desde el margen distal de la última ventosa del ectocotilo hasta el extremo distal del calamus.

4.2. **Indices**

Con los datos de mediciones obtenidos se determinaron los siguientes Indices morfométricos –Tabla 1–:

– Indice del ancho del manto (IAM): tanto en machos como en hembras el ancho del manto supera el 50% de la longitud del mismo. El promedio del índice se muestra superior en hembras, diferencia que aparece como real teniendo en cuenta los resultados que se detallan en el punto siguiente al estudiar la relación de crecimiento LM/AM para cada caso.

– Indice del ancho de la cabeza (IAC): la anchura de cabeza resulta en ambos sexos inferior al 50% de la LM.

– Indice de la longitud de la lígula (ILL = $\frac{LL \cdot 100}{LM}$).

Los resultados obtenidos evidencian gran variabilidad en la morfometría de la lígula y calamus –no descartándose "errores" de medición dado el carácter eminentemente muscular y el pequeño tamaño de estas estructuras–. Sobre 122 determinaciones efectuadas, el 90% de ellas arrojó valores comprendidos en el intervalo 1,5-3,5; siendo los valores máximo y mínimo determinados 3,90 y 1,55 respectivamente.

– Indice de la longitud del calamus (ILC = $\frac{LC \cdot 100}{LM}$)
la relación morfométrica entre lígula y calamus evidenció también gran variabilidad; el ILC osciló entre 15 y 30 en el 87% de los casos. Valor máximo determinado: 33,3; mínimo: 12,0.

TABLA 1

Indices Ancho del Manto (IAM). Ancho de la Cabeza (IAC) Valores Promedio.

	Hembras	Machos	Hembras y Machos
$IAM = \frac{AM \times 100}{LM}$			
n =	218	191	409
$\bar{x}$ =	69,63	63,82	66,95
S =	6,78	7,25	6,55
Int. Conf. =	69,63 ± 0,90	63,82 ± 1,02	66,95 ± 0,37
$IAC = \frac{AC \times 100}{LM}$			
n =	217	191	407
$\bar{x}$ =	42,28	40,65	41,53
S =	5,05	5,85	5,49
Int. Conf. =	42,28 ± 0,67	40,65 ± 0,82	41,53 ± 0,53

4.3. **Relaciones morfométricas. Crecimiento relativo.**

Teniendo en cuenta que las proporciones relativas existentes entre los parámetros morfométricos de un individuo se modifican a lo largo de su vida –Wilbur & Yonge, 1964–, se analizaron las variaciones que experimentan tales relaciones según el sexo y la talla.

La ecuación: $y = a \cdot x^b$ describe correctamente la relación de proporción entre dos parámetros morfométricos durante el crecimiento. En este caso se toma como variable independiente a la longitud del manto (LM) (x en la ecuación dada); siendo el ancho del manto (AM) y ancho dñe la cabeza (AC) los términos dependientes (y) según sea la relación que se estudia.

Los valores de las constantes a y b se obtienen a partir de la regresión logarítmica:

$$\lg y = \lg a + b \cdot \lg x$$

Los datos analizados corresponden a un lote de 219 ejemplares discriminados por sexo, cuya talla (LM) estuvo comprendida entre 20 y 90 milímetros; intervalo que cubre una gran parte del espectro de talla de la especie.

Los coeficientes de correlación calculados para las relaciones LM/AM y LM/AC, muestran un eelvado nivel de correlación. Tabla 2.

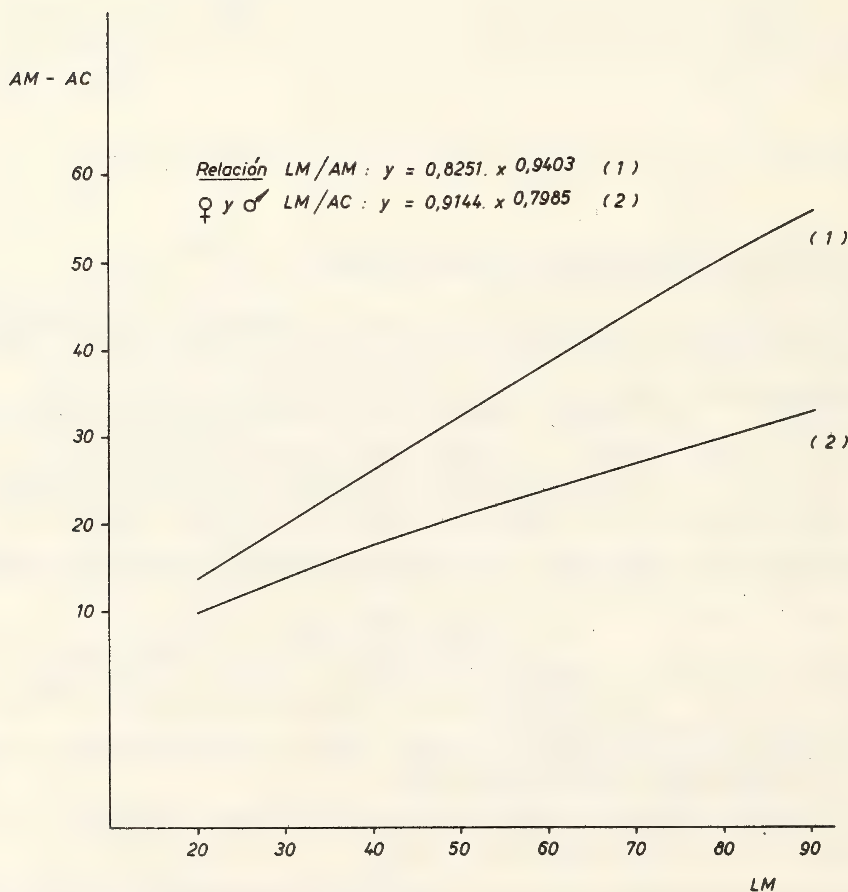
Los valores del coeficiente b diferentes de la unidad indican un crecimiento de tipo alométrico, es decir, uno y otro parámetro se incrementan en proporciones diferentes.

La relación largo manto/ancho manto (LM/AM) determinada para el conjunto de ejempalres (machos + hembras) muestra una myy leve alometría netativa (b = 0,9403) Tabla 2 Gráfico 1.

TABLA 2

Crecimiento relativo entre los parámetros: Largo Manto/Ancho Manto (LM/AM) y Largo Manto/Ancho Cabeza (LM/AC) - Cálculos de regresión para el Total de individuos (n = 219) y discriminados por sexo. Coeficiente de Correlación r.

	Relación LM/AM	Relación LM/AC
♀ + ♂	$y = 0{,}8251 \cdot x^{0{,}9403}$ $r = 0{,}9168$	$y = 0{,}9144 \cdot 0{,}7985$ $r = 0{,}9086$
♀ n = 117	$y = 0{,}6687 \cdot x^{1{,}0046}$ $r = 0{,}9406$	$y = 0{,}8040 \cdot x^{0{,}8361}$ $r = 0{,}9239$
♂ n = 102	$y = 1{,}0032 \cdot x^{0{,}8770}$ $r = 0{,}9462$	$y = 1{,}0324 \cdot x^{0{,}7615}$ $r = 0{,}9094$



Al considerar la misma relación discriminada por sexos se nota que en el caso de las hembras el valor del coeficiente b es igual a 1; ello significa que el crecimiento de LM respecto al AM responde al tipo isométrico; la proporción LM/AM se mantiene invariable a lo largo de la vida de los individuos. Tabla 2 Gráfico 2.

Para los machos, por el contrario, el coeficiente b = 0,8770 es indicador de la ocurrencia de alometría negativa en el crecimiento de LM/AM en este sexo.

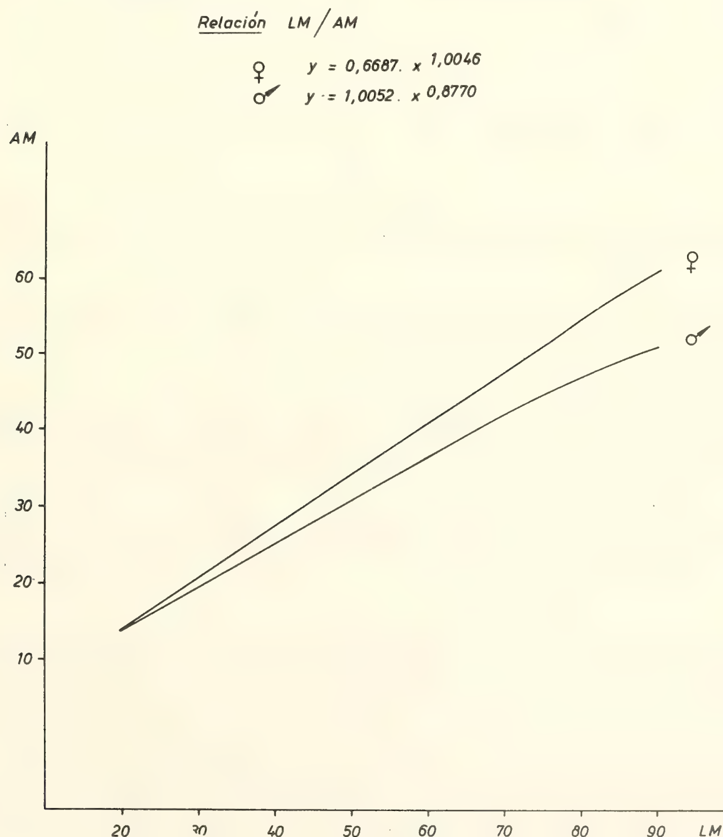
Se concluye pues en que la relación LM/AM evoluciona según modalidades diferentes en machos y hembras –a partir del intervalo 20-30 mm; correspondiendo a aumentos unitarios en largo del manto, un incremento en el ancho más acentuado en las hembras que en los machos. Este hecho deberá ser contemplado al efectuar determinaciones de tal proporción o al comparar poblaciones o especies.

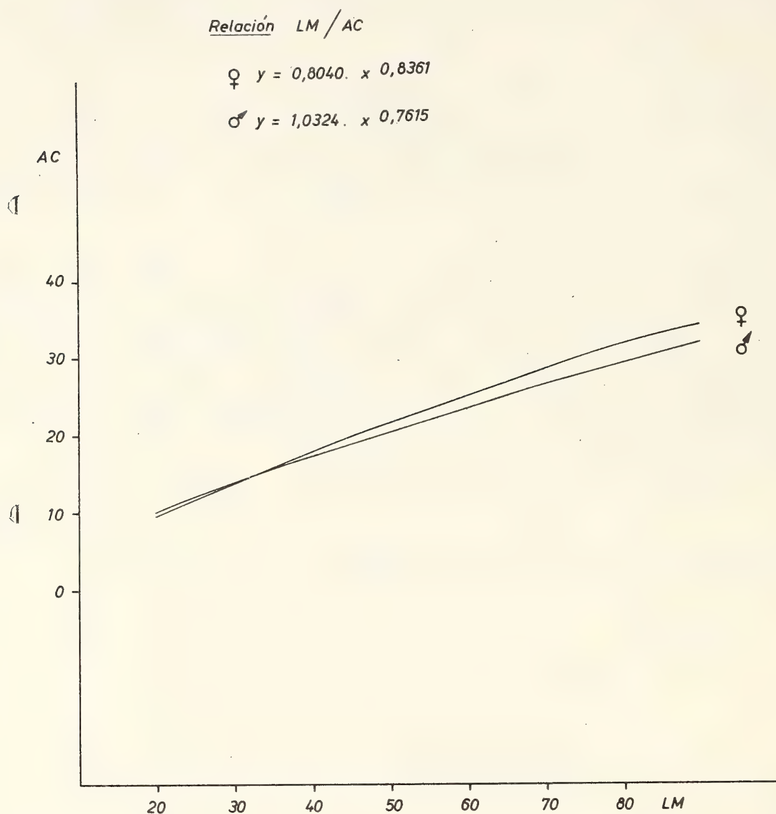
El incremento más acusado en el ancho del manto para las hembras está ligado al creciente aumento del volumen gonadal al progresar en su maduración; no descartándose incluso alteraciones de distinto grado en la relación LM/AM de acuerdo con el estadío de madurez considerado. Similares observaciones han realizado Morales (1959) sobre **Eledone cirrhosa** Lam. y recientemente Guerra & Manriquez (1980) para **Octopus vulgaris** Lam

La relación largo manto&ancho cabeza(LM/AC) determinada para ambos sexos en conjunto, responde a un crecimiento alométrico negativo.

Similares resultados obtienen Mangold & Portman (1964) para varios octopodos del Mediterráneo.

Al estudiar la relación LM/AC para cada sexo se observa una alometría de crecimiento de AC más acentuada en los machos. Tabla 2; Gráfico 3.





5. ESTRUCTURA DE LA POBLACION DE OCTOPUS TEHUELCHUS EN BALIZA SAN MATIAS.

En el análisis de este aspecto de la dinámica poblacional a partir de la evolución temporal de los modelos de distribución de frecuencias de longitud de manto –realizados según clases de 6mm es necesario considerar los siguientes hechos:

a.– Las poblaciones de **Octopus tehuelchus** no son estables ya que presentan desplazamientos en profundidad relacionados con la época del año y, hasta cierto punto, con las condiciones de altura de marea.

b.– El prolongado período de puesta, al que posteriormente se hará referencia, motiva la aparición de sucesivas generaciones de juveniles a lo largo del año; aportando varios "grupos de edades" en evolución, lo que dificulta la interpretación de los diagramas resultantes. Gráfico 4.

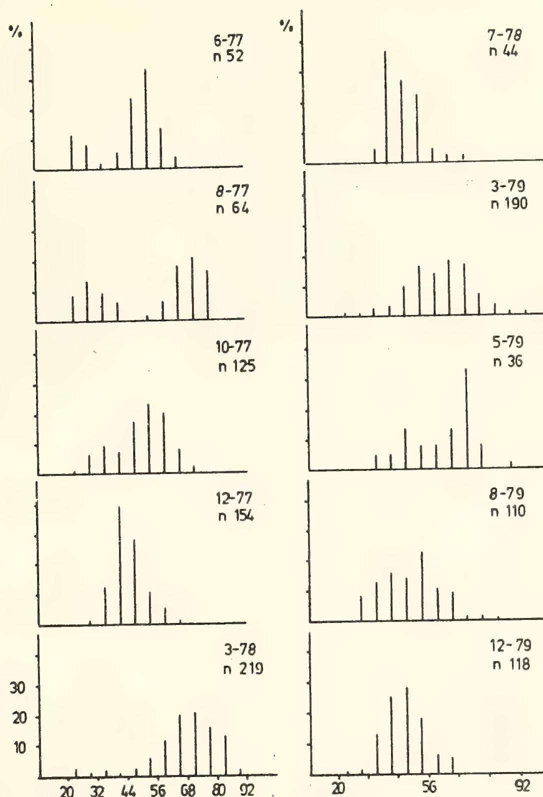
El mes de junio '77 muestra una distribución de tallas en la que se distingue un grupo modal centrado en la clase 20-26 mm. –juveniles–; y un segundo modo en la clase de 50 a 56 mm. que en su evolución se extingue en diciembre '77. El conjunto de juveniles llegado este mes se ha desplazado ocupando el rango de 32-56 mm. y resultan dominantes en la estructura poblacional.

En los meses de verano se manifiesta una acentuada tasa de crecimiento que lleva al grupo en cuestión a ubicarse en el intervalo 56-86 mm. en marzo '78, mes en el cual comienza la incorporación de una nueva generacón de juveniles. La falta de abundante muestreo en el año 1978 impide seguir la evolución a través de este período.

GRAFICO 4

Distribucion de Frecuencias de Longitud del Manto

Segun Clases de 6 mm



El mes de marzo de 1979 repite una estructura similar a la de 1978, con un grupo de juveniles que se insinúa y las clases mayoritarias comprendidas entre los 44 y 80 mm de LM. La progresión en el tiempo no resulta clara pero se arriba al mes de diciembre de 1979 con una estructura de población significativamente similar a la de igual mes de 1977.

Generalizando se puede resumir el ciclo de evolución de la estructura poblacional de **O. tehuelchus** en Baliza San Matías tomando como referencia las estructuras poblacionales de marzo y diciembre.

– el mes de marzo se caracteriza por la presencia de un amplio espectro de tallas dentro del que resultan dominantes las cmprendidas en las clases 56-86 mm –histograma 3-78 y 3-79–; este conjunto representa al grueso de individuos reproductivos que luego de la puesta se ha extinguido llegado el mes de diciembre.

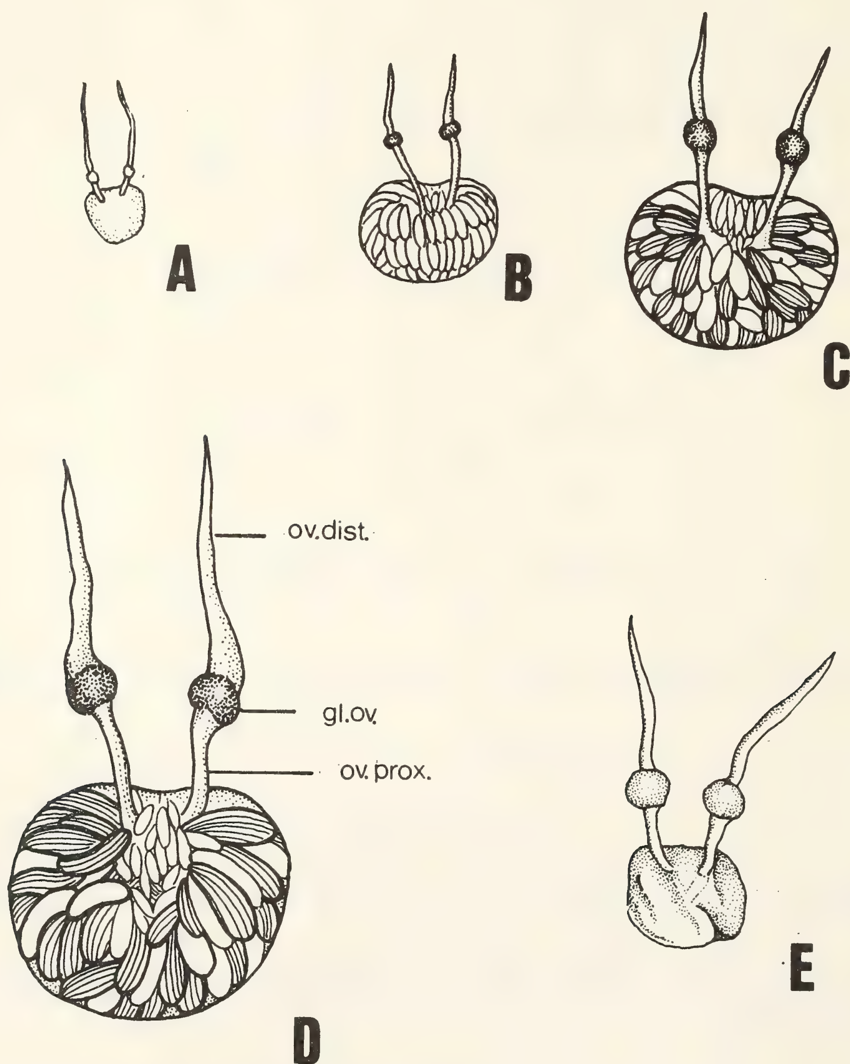
– Los histogramas correspondientes a diciembre ('77 y '79) muestran un esquema concordante con la lógica evolución de la estructura observada en el mes de marzo; claramente unimodal, sus integrantes representan aquel conjunto minoritario –clases 20-40 mm.– de marzo, más las sucesivas incorporaciones de juveniles que se funden a éstos a lo largo del año –evidente en la serie: 6-77 / 12-77–. Un incremento importante logrará el valor modal de este grupo para alcanzar la configuración del mes de marzo próximo.

6. REPRODUCCION

6.1. Anatomía de la gónada femenina y anexos

El celoma ovárico se ubica en el extremo posterior de la cavidad del cuerpo; quedando vinculado por una delgada membrana al celoma pericárdico-renal y al ansa intestinal.

Las dimensiones del gonacel varían según el estado de madurez y número de ovas que contenga. Lám. 2



El estroma ovárico es conjuntivo muscular; se desarrolla sobre la cara interna de la pared anterior, cefálica, del celoma; destacándose su rica vascularización. De él parten una serie de ramificaciones, que a modo de cordones se extienden hacia la región posterior, sobre la que se asientan los ovocitos en distintas estapas de desarrollo. Fotos 1 y 2.

El crecimiento y maduración de las células femeninas determina que los ovocitos, ya pedunculados, se dispongan radialmente respecto al disco germinal provocando la repleción del gonocel.

La evacuación de las gametas se produce a través de un par de oviductos, que naciendo dorsalmente a la gónada, se incurvan y corren a ambos lados de la cavidad corporal hasta la proximidad de la abertura del manto.

En la región media de cada ducto se diferencia una glándula oviductal; su presencia permite definir un oviducto proximal –porción anterior a la glándula– y un oviducto distal, posterior a la misma. Lám. 2.

En sección transversal el oviducto proximal presenta un epitelio cilíndrico simple fuertemente ciliado, que se eleva en forma de varias crestas longitudinales (7 a 10) hacia la luz interior.

La pared del ducto, gruesa y netamente muscular, está dada por una trama escasa de tejido conjuntivo en la que se incluyen abundantes fibras musculares cuya disposición dominante es circular –se observan fibras longitudinales en la base de las crestas e inmediatamente debajo del epitelio de revestimiento.

Externamente la pared se completa con una zona de tejido conjuntivo, muy vascularizado, en la que disminuye sensiblemente el número de fibras musculares.

Las glándulas oviductales son un par de órganos de forma aproximadamente esférica, dependiendo su volumen y coloración del estado de madurez gonadal, siendo sus características extremas para la inmadurez y el grado máximo de maduración: color, de blanco a pardo oscuro; diámetro transverso, de 2 a 6 mm. –ver caracterización detallada en 6.4. –Foto 3–.

El eje glandular queda determinado por el oviducto proximal que penetra algo más allá de su porción media –Foto 3–, para abrir a la cavidad del órgano, desplazada hacia un polo.

Un razgo anatómico saliente resulta de la perfecta simetría radial que adoptan sus componentes internos. A la cavidad glandular desembocan dos tipos de estructuras:

a) Las espermatecas, estructuras tubulares que en número de 26 adoptan una disposición coaxial con el ducto proximal. –Fotos 3 y 4–.

b) Una serie de túbulos o sacos aplanados que integran la porción glandular propiamente dicha, que se ubican radialmente por fuera de las espermatecas –igualmente en número de 26– –Fotos 3; 5; 6–

Las espermatecas presentan un epitelio cúbico simple que tapiza el límen. Externamente una delgada pared de fibras musculares forma una vaina contráctil que presupone un mecanismo de vaciamiento peristáltico. Los espermatozoides que allí se almacenan adoptan una disposición regular y ordenada, ubicándose radialmente, unidos lateralmente por sus cabezas, en contacto con las células del epitelio del reservorio –Foto 4–.

El tejido glandular se desarrolla en dos porciones diferentes definidas por el producto de secreción; ya que los sáculos que lo integran presentan, en ambos casos, un epitelio formado por células cilíndricas altas de núcleo basal entre las que se intercalan células ciliadas.

Las paredes entre dos sacos contiguos se hallan prácticamente en contacto, no diferenciando más que escasas fibras musculares y vasos sanguíneos entre ellas. –Foto 5–.

La porción glandular cortical se caracteriza por producir una secreción de naturaleza proteica, que es almacenada bajo la forma de pequeñas esférulas basófilas, llegando a ocupar en el momento de actividad máxima la totalidad del citoplasma celular –Foto 6–.

Netamente diferenciado de ésta –aunque no por limitante tisular alguno– se desarrolla la porción glandular interna, caracterizada por la producción de mucopolisacáridos ácidos, fácilmente detectables por la reacción positiva frente al azul Alcián.

De ambas fracciones glandulares, la cortical es la que alcanza mayor extensión.

La caivdad de la glándula es amplia; resultando compartimentada por la presencia de tabiques o septos incompletos que en número de 25 determinan la existencia de 26 cámaras abiertas hacia el centro glandular –Foto 7–. Cada septo está formado por un sostén conjuntivo-muscular cubierto por un epitelio cúbico simple caracterizado por una densa ciliatura. Cada una de las cámaras descriptas se extiende hacia el polo proximal en invaginaciones a modo de cortos tubos –cuyo epitelio de revestimiento es igualmente cúbico ciliado– sobre los que abren la espermateca y el sáculo glandular correspondiente al radio en cuestión.

La porción distal del oviducto nace a continuación de la cavidad de la glándula oviductal –foto 8 y 9– y al abandonar a ésta se acoda sobre sí dirigiéndose anteriormente hasta su apertura a los lados del sifón. Se observa una progresiva disminución de su diámetro desde su origen hasta la apertura al exterior.

Un epitelio simple de células cilíndricas altas reviste las amplias crestas longitudinales y transversales –Foto 10– que se desarrollan hacia la luz. Este epitelio apoya sobre un delgado estrato de fibras musculares longitudinales a la que sigue un grueso paquete de fibras circulares y finalmente una de menor espesor en la que las fibras se disponen longitudinalmente; en todos los casos incluidas en una matriz conjuntiva.

El rol de las glándulas oviductales ha sido objeto de controversias durante largo tiempo. Algunos autores consideran a esta estructura de características -unicamente glandulares mientras que otros le asignan una función sólo almacenadora.

Froesch y Marthy (1975), estudian detalladamente la anatomía y función de las glándulas oviductales de **Octopus vulgaris** Lemarck. Destacan en su descripción la presencia de tres grupos de estructuras periféricas, integradas cada una por 20 compartimientos dispuestos radialmente respecto del oviducto y que vacían distalmente en la cámara central de la glándula.

Estos sacos son: las espermatecas, glándulas centrales y glándulas perisféricas. Los sacos glandulares si bien están revestidos por un peitelio de características similares –células glandulares y ciliadas– se encuentran separados –cada uno– por tabiques de tejido conjuntivo.

Los productos de secreción de ambos tipos glandulares difieren en su composición química. Las glándulas perisféricas secretan mucoproteínas –de naturaleza cementante– y las centrales, mucopolisacáridos –que polimeriza las mucoproteínas en contacto con el agua–. Ambos compuestos químicos envuelven al huevo en la cavidad glandular.

En el caso de **Octopus tehuelchus** se establece pues la doble función de la glándula oviductal.

Un rasgo diferencial importante entre las glándulas de **O. tehuelchus** y **O. vulgaris** es que el tejido glandular de **O. tehuelcus** si bien se diferencia en una porción cortical y otra interna, con las características ya descriptas, no presenta tabiques tisulares entre ellas ni entre sáculos contiguos –Foto 3, 5, 6–.

Las espermatecas actúan como reservorio de esperma aunque este no es sitio exclusivo de retención de los mismos.

En concordancia con lo descripto por Peterson (op. cit.) para **O. bimaculoides** se observó importante cantidad de esperma fuertemente empaquetado en contacto y cubriendo toda la superficie del epitelio de revestimiento de las crestas longitudinales, transversales y pared del oviducto distal, que a juzgar por la estructura ya descripta y el perfecto ordenamiento de los espermios pareciera estar pre-formado para tal función –Fotos 9 y 10–.

Una característica importante de destacar es que los espermatozoides almacenados en las espermatecas y oviductos distales adoptan la misma disposición. –Fotos 4, 9, 10–.

Se observó asimismo la presencia de esperma en la -ultima porción del oviducto proximal y en el tramo en que corre por el interior de la glándula oviductal.. Las gametas masculinas en este caso ocupan las exilas existentes entre las crestas longitudinales de los ductos.

Las hembras de **Octopus tehuelchus** son receptivas aparentemente desde temprana edad para el acoplamiento ya que almacenan esperma antes de alcanzar la madurez total –se han colectado hembras en estado de madurez media, de acuerdo con la escala de madurez propuesta, con sus oviductos distales dilatados como consecuencia del notable volumen de espermatozoides que contienen. –Fotos 8, 9, 10–.

Acorde con la presencia de espermatozoides en los ductos y espermatecas, las glándulas oviductales experimentan transformaciones evidenciadas por el aumento progresivo de tamaño y el cambio de coloración debidos, sin dudas, al caudal de gametas y la máxima actividad de las glándulas perisféricas respectivamente.

Wells y Wells (1972) y Froesch (op. cit.) como resultado de sus investigaciones, que comprenden mantenimiento de ejemplares en laboratorio, revelan que las hembras de **O. vulgaris** se acoplan y almacenan esperma en sus glándulas oviductales incluso varios meses antes de alcanzar la madurez, avalado por la presencia de espermatecas.



FOTO 1.– Sección del estroma ovárico. Secuencia ovocitaria.
v.s.: vaso sanguíneo.
H y E X60

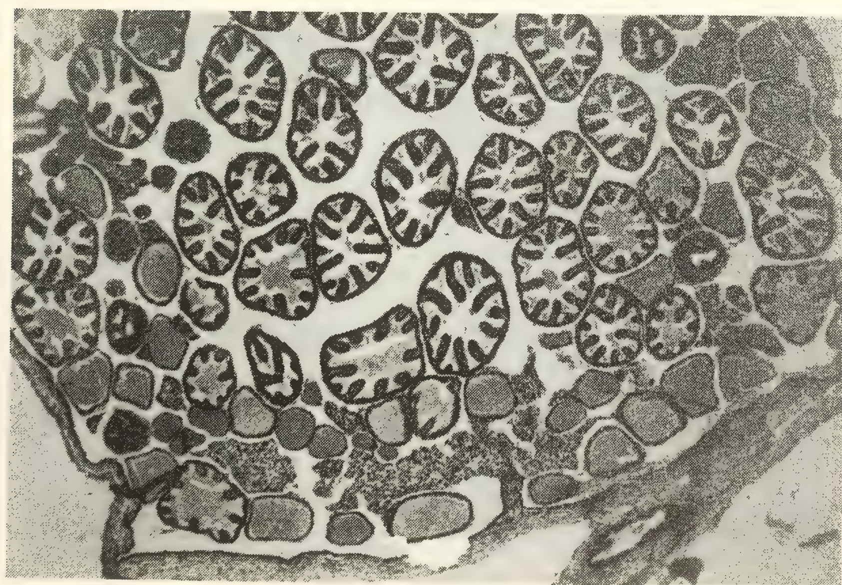
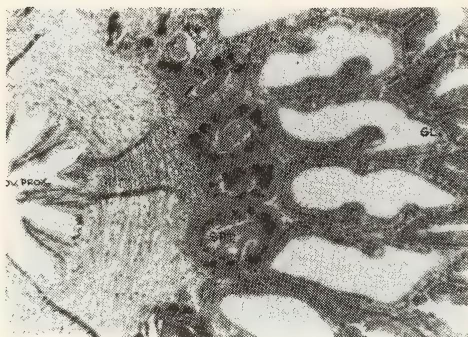


FOTO 2. – Sección del ovario. Ovocitos en diferentes estados de desarrollo ocupan el gonocel. Se observa la estratificación ovocitaria.
H y E; X32.



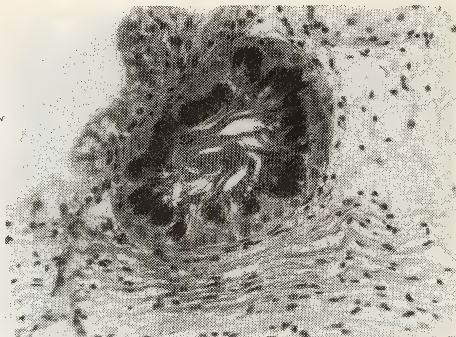
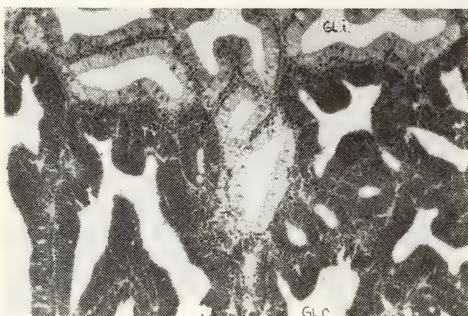


FOTO 3. – Sección transversal de la glándula oviductal. ov. prox.: oviducto proximal; spt.: espermateca gl.; tejido glandular.
H y E: 100X.

FOTO 4. – Detalle de espermateca. sp: espermatozoides.
H y E: 250X.



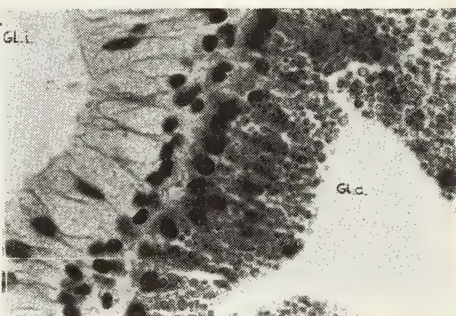
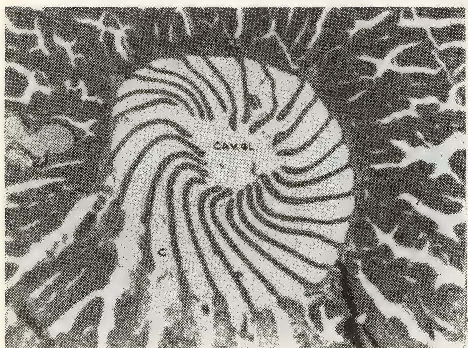


FOTO 5. – Glándula oviductal. Porción glandular cortical (gl. c.) y porción glandular interna (gl. i.).
H y E: 160 X.

FOTO 6. – Glándula oviductal. Detalle de la porción glandular cortical e interna. H y E; 400 X.
FOTO



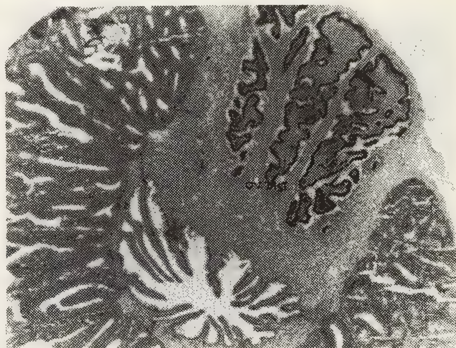


FOTO 7. – Glándula oviductal. Sección transversal de la cavidad central. c: cámaras; cva. gl.: cavidad glandular. H y E; 40 X.

FOTO 8.– Glándula oviductal. Sección transversal de la glándula a nivel del nacimiento del oviducto distal. ov. dist.: oviducto distal. H y E; 40 X.

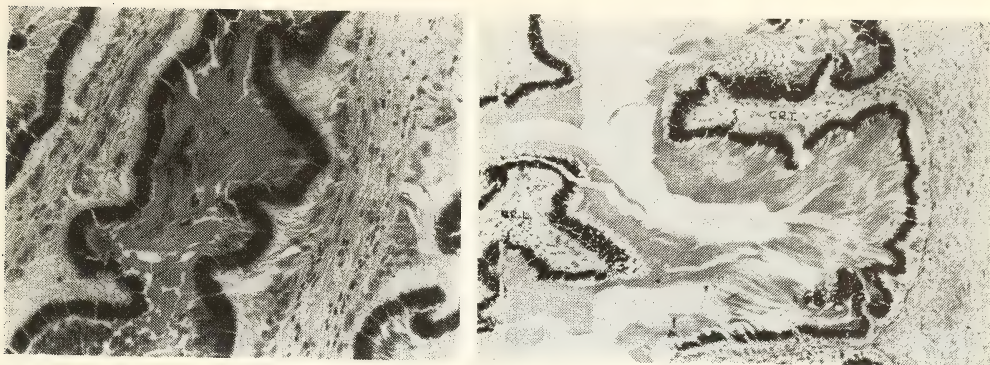


FOTO 9. – Detalle de 8. Primera porción del oviducto distal. H y E; 250 X.

FOTO 10. – Sección longitudinal del oviducto distal. cr. 1.: cresta longitudinal; cr. t.: cresta transversal. H y E; 250 X.

6.1.1. – **Evolución de la serie germinal femenina.**

El enfoque general de este trabajo lleva a considerar a los fenómenos reproductivos en su proyección poblacional, sin embargo es necesario particularizar sobre ciertos aspectos citológicos en la evolución de las células sexuales femeninas.

Como en otros cefalópodos, se observa en **Octopus tehuelchus**, el desarrollo paralelo de la célula femenina y del complejo folicular que la acompaña; de tal modo es posible establecer una serie de estadíos o fases de la evolución gonial que quedan definidos por características citológicas propias de la célula germinal y de los elementos celulares que integran el epitelio folicular.

Se detallan a continuación los distintos "tipos ovocitarios" que se evidencian durante la ovogénesis de **O. tehuelchus:**

– **Tipo ovocinario I**:

Ovocitos depequeña talla, aún incluidos en el estroma ovárico, mononucleolares.

Las primeras etapas de la gametogénesis femenina –multiplicación y proliferación gonial– se suceden en forma rápida y tempranamente en la vida del organismo. Debido a esto, ya en individuos de 24 mm. de longitud del manto (talla mínima investigada) son escasos los elementos que conservan la caracterización apuntada.

– **Tipo ovocitario II**:

Ovocitos de talla promedio de 54 μ (s = 8,14; n = 19), sobre cuya membrana se desarrolla un estrato de células foliculares aplanadas y elongadas –altura media 5 μ –. La característica nuclear saliente está dada por la fragmentación del nucleolo en varios cuerpos, por lo general uno de ellos de mayor tamaño –3,5 a 6 μ–. Diámetro nuclear promedio: 28,25 μ (s = 3,11), Gráfico 5.

Este tipo celular se observa claramente diferenciado del estroma conjuntivo-muscular y relacionado a él a través de un corto pedúnculo. –Fotos 11 y 12–.

– **Tipo ovocitario III**:

Aumento acentuado del diámetro celular, alcanzando valores promedio de 108 μ (s = = 22; n = 48). El núcleo mantiene las características del estadío anterior –persisten los fragmentos nucleolares– aumentando su diámetro a un valor promedio de 41,0 μ (s = 5,40).

Una segunda capa de células foliculares se desarrolla internamente a la anterior; compuesta por elementos cúbicos –cuya talla fluctúa entre 6 y 8,6 μ –.

Ambas capas foliculares se extienden en un pedúnculo pronunciado que relaciona al ovocito –libre hacia la cavidad del saco ovárico– con el estroma. –Fotos 13 y 14–.

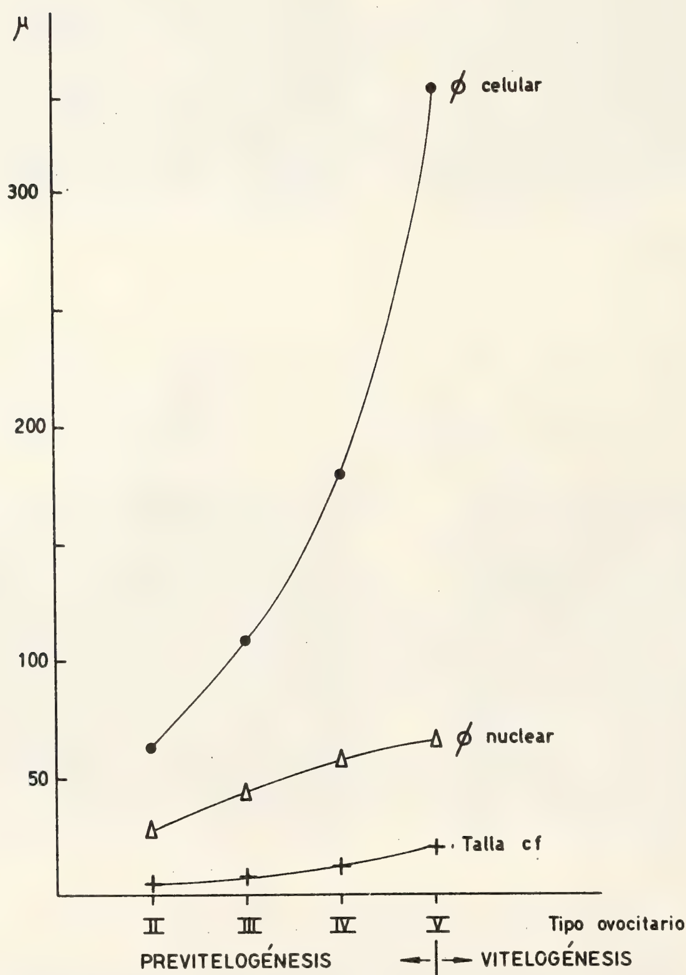
– **Tipo ovocitario IV:**

A este estado corresponde una talla ovocitaria promedio de 180 μ (s = 37; n = 40) y un diámetro nuclear promedio de 57,25 M (s = 5,90). Se produce la desintegración de los cuerpos nucleolares diseminándose su material en el núcleo.

El epitelio folicular manifiesta una activa proliferación en puntos localizados de la superficie del ovocito provocando su invaginación a esos niveles constituyendo así los esbozos de los pliegues que progresivamente se profundizan en el ooplasma. Los tejidos involucrados en este fenómeno coresponden exclusivamente a la capa interna de las células foliculares, las que además sufren un cambio en su forma adoptando una configuración cilíndrica –talla media: 9 - 12 μ–. –Fotos 15, 16 y 17–.

Grafico N.º 5

Variación del diámetro celular, nuclear y Talla de las células foliculares.



– **Tipo ovocitario V:**

Llegado este punto la talla celular se ha duplicado – $\bar{X}$ = 344 μ; s = 58; n = 31. El diámetro nuclear medio es de 64,37 μ (s = 4,44).

Se ha completado la formación del complejo de pliegues foliculares; su número es aproximadamente constante y oscila entre 11 y 13 por ovocito; las células foliculares son cilíndricas altas –su talla máxima alcanza los 24 μ –; la base de cada pliegue está ocupada por un vaso sanguíneo.

Los pliegues foliculares se extienden longitudinalmente respecto del eje mayor del ovocito; siendo independientes unos de otros por no existir uniones o puentes transversales como ocurre en **Sepia officinales** Lamarck. –Fotos 18 y 19–.

– **Tipo ovocitario VI:**

El epitelio folicular inicia la secreción de material nutricio hacia el ooplasma provicando el mayor aumento en volúmen que se registra en la célula femenina a lo largo de su desarrollo. Fotos 20 y 21.

El final de la vitelogénesis está señalado por el progresivo estrechamiento –Foto 22– y retracción de los pliegues,

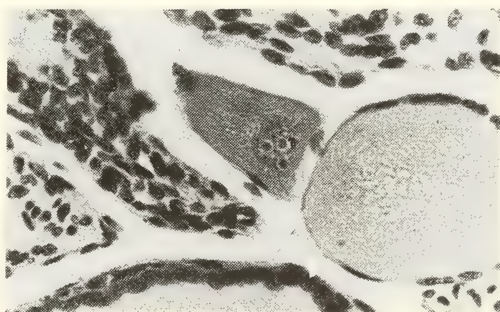
El diámetro de los "ovocitos maduros" alcanza un valor promedio de 3,8 mm. (s = 1,60; n = 22), su longitud oscila entre 10 y 12 mm.

El gráfico 5 resume la evolución paralela de talla celular, diámetro nuclear y talla de las células foliculares a través de los tipos ovocitarios II, III, IV y V.

La determinación de los estados ovocitarios descripta se efectúa teniendo en cuenta los esquemas delineados por Richard y Dhainaut para **Sepia officinalis** Lamarck, (1973) y decápodos en general (1976); Selman y Arnold para **Loligo pealei** Les., (1977); Schuldt para **Illex argentinus** Castellanos, (1979); siendo la única referencia hallada para **Octopus** la propuesta por Bolognari et. al. (1975).



11



12

FOTOS 11 y 12. – Tipo ovocitario II. ***n***: nucleolo; ***c.f.:*** células foliculares. H y E; 400 X.

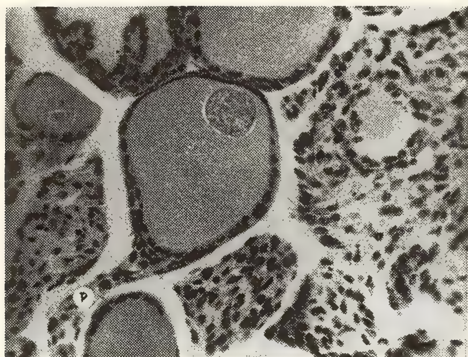
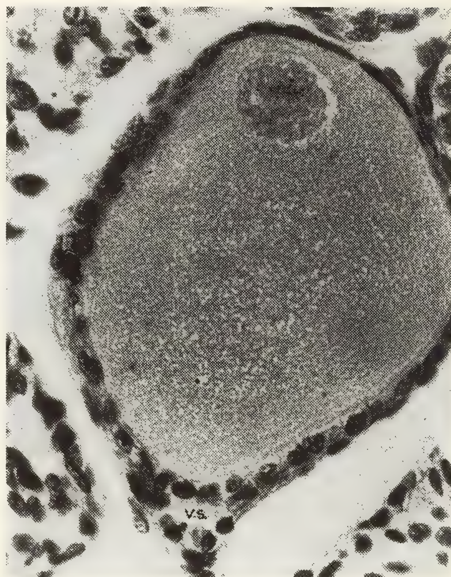


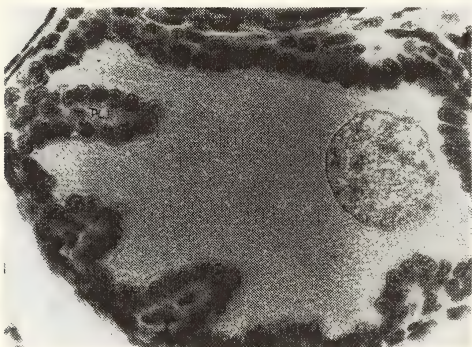
FOTO 13. – Tipo ovocitario III: p: pedúnculo. H y E; 200 X.



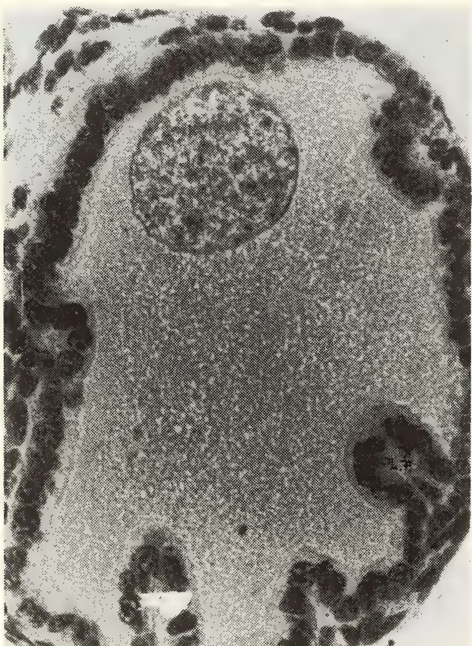
14

FOTO 14. – Detalle de 13. v.s. H y E; 400 X.

15



16



17



FOTOS 15, 16 y 17. – Tipo ovocitario IV: Formación de pliegues foliculares. pl.f.: pliegues foliculares. H y E; 400 X.



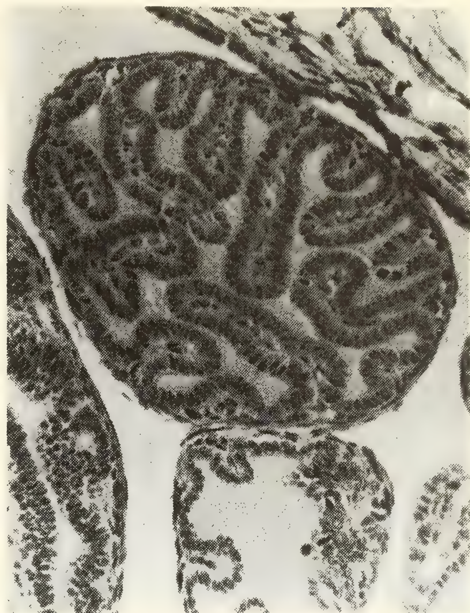


FOTO 18. – Tipo ovocitario V: Sección longitudinal. H y E; 100 X.
FOTO 19. – Tipo ovocitario V: Sección transversal. H y E; 100 X.

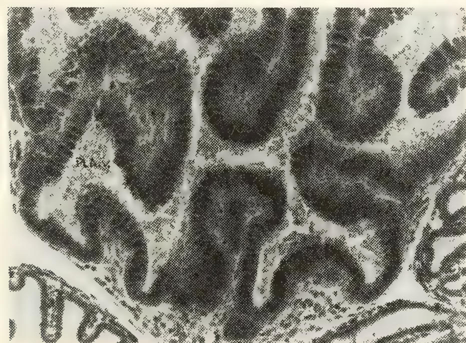




FOTO 20. – Tipo ovocitario VI: Vitelogénesis. pla. v.: plaquetas de vitelo. H y E; 250 X.

FOTO 21. – Detalle de 20. H y E; 250 X.

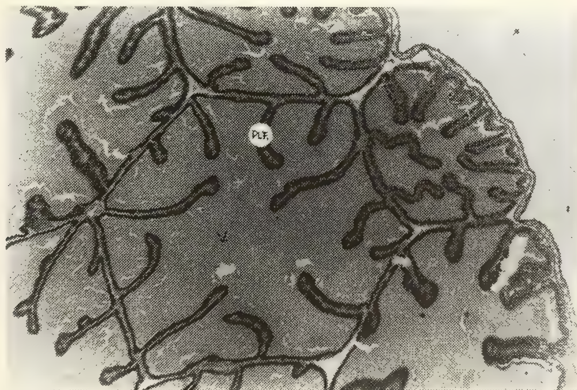


FOTO 22. – Tipo ovocitario VI: Vitelogénesis avanzada. v; vitelo. H y E; 40 X.

6.2. Anatomía de la gónada masculina y anexos.

La gónada masculina se ubica ventralmente en el extremo posterior de la cavidad del manto. La masa testicular se localiza dentro del gonocel y se encuentra rodeada por una segunda membrana que envuelve también a las glándulas accesorias –llamada cápsula central por Peterson, 1959–. El celoma testicular, como el ovárico, se vincula con el celoma pericárdico-renal y el ansa intestinal a través de una delgada membra.a –Lámina 3–.

La comunicación del testículo con las glándulas anexas se establece sobre la superficie lateral izquierda, por medio del conducto deferente cuya porción proximal se adosa a la cara interna del gonocel.

El testículo es de forma aproximadamente esférica, aplanado en su cara lateral izquierda –lugar donde se asientan las glándulas accesorias–.

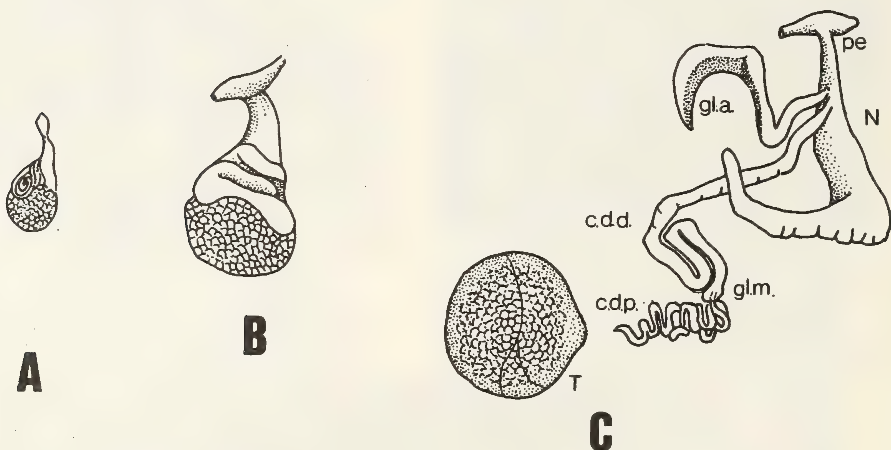
Lo conforman un conjunto de túbulos separados por delgados septos conjuntivos, en donde se produce la proliferación y maduración de los elementos goniales.

La gametogénesis de **O. tehuelchus** no se aparta del esquema general descripto para los cefalópodos.

Si bien no se puede precisar una talla en la que se produce la primera maduración, ésta tiene lugar en el intervalo 30 a 40 mm.

Los individuos menores de 30 mm. de longitud de manto presentan gónadas en las que el proceso dominante es el de multiplicación y proliferación gonial. –Fotos 23 y 24–.

A partir de esta talla tiene lugar la diferenciación de los distintos tipos celulares que conforman el epitelio seminal; finalmente la maduración gamética se generaliza en individuos de más de 40 mm. de longitud. –Fotos 25 y 26–.



LAMINA 3.– Gónada masculina y anexos. Estados de Madurez.
A: Inmadurez (M1); **B**: Madurez (M2); **C**: Testículo (T) y complejo glandular.

conducto deferente proximal (c.d.p.), conducto deferente distal (c.d.d.) glándula mucígena (gl.m.), glándula accesoria (gl.a.), bolsa de Needham (N), "pene" (pe).
Escala: 1:1.

LAMINA 3

El intervalo considerado es coincidente con el rango de tallas en las que es posible encontrar o no espermatóforos en formación y/o almacenados en la bolsa de Needham.

Es a partir de los 40 mm. de longitud del manto en que la presencia de espermatóforos es constante.

El proceso de evacuación involucra en sus primeras etapas a la zona centrla del testículo y progresivamente se expande hacia la periferia.

El Complejo Glandular comprende: el conducto deferente proximal y distal –diferenciados estructural y funcionalmente–, la glándula mucígena, la glándula accesoria, la bolsa de Needham y la papila peniana. Lámina 3.

La evacuación del testículo se produce a través del conducto deferente proximal, de pequeño diámetro y fuertemente contorneado.

En sección transversal presenta un epitelio simple, cilíndrico y ciliado que se eleva en nuemrosos pliegues longitudinales cuya altura se atenúa cuando el tubo alberga espermatozoides.

La pared está formada por una fina capa de tejido conjuntivo con abundantes fibras musculares de disposición circular. –Foto 27–.

La transición hacia la porción distal del ducto es evidenciada por la presencia de la glándula mucígena –denominada así por Peterson (op. cit.)– Foto 28, 29, 30–. Esta se origina como una estructura globosa, bien diferenciada, a un lado de la última porción del conducto deferente proximal.

El corte transversal del conjunto muestra dos compartimientos bien definidos, la glándula mucígena y el conducto deferente. –Fotos 28 y 30–.

La desembocadura de esta glándula se produce a nivel de la transición entre conducto deferente proximal y distal. –Foto 31–.

A partir de este punto el tejido conjuntivo que ligaba la glándula mucígena y el deferente proximal se invagina hacia la luz de la zona intermedia del ducto originando un septo que discurre sobre toda la longitud del deferente distal –C.D.D.– separando dos áreas, una glandular y otra, donde el producto de esas glándulas origina las membranas constitutivas del espermatóforo. El epitelio de revestimiento del C.D.D. es, por tanto, eminentemente glandular –Fotos 32 a 36–.

El tejido de la glándula mucígena se prolonga en la primera porción del C.D.D., poco más allá de la aparición del septo. Fotos 32 y 33.

En la porción media del C.D.D. se desarrolla un nuevo tipo glandular cuyos tejidos se invaginan a nivel de la porción del epitelio del C.D.D. opuesta a la pared convexa del septo. El epitelio de revestimiento de esta cresta glandular al igual que el del septo medio está constituida por células cilíndricas muy altas –de carácter glandular– entre las que se intercalan células ciliadas. –Fotos 37, 38 y 39–.

En la última porción del C.D.D., la cresta glandular, dominante en la región media, se reduce casi totalmente quedando representado sólo el eje conjuntivo tapizado por el epitelio ciliado cilíndrico propio del C.D.D. –Fotos 40 y 41–.

El septo longitudinal se afina y reclina sobre la pared desapareciendo cuando el ducto finaliza.

La pared del conducto es muy fina, formada por tejido conjuntivo-muscular y altamente vascularizado.

El conducto deferente penetra en la glándula accesoria en la proximidad de su comunicación con la bolsa de Needham; el conjunto se apoya sobre la pared de ésta.

La glándula accesoria es un saco glandular ciego alargado y curvado distalmente –el ensayo con azul Alcián dio reacción negativa–. En ella el espermatóforo completa su formación y cambia de posición. –Foto 42–.

El cuello de la glándula –adosado a la bolsa de Needham– se comunica con ella por su extremo proximal.

La bolsa de Needham, que aloja a los espermatóforos que ha completado su formación, consta de una fina pared de tejido conjuntivo-muscular que se invagina originando cortos y delgados septos muy ramificados; diferenciándose en la zona media un septo más pronunciado y plegado que la divide parcialmente. Entre estos pliegues secundarios se ordenan los es-

permatóforos paralelos entre sí y respecto del septo —con el aparato eyeculador curvado y dirigido hacia el extremo ciego de la bolsa. Esta se continúa a través de un corto pedúnculo co la papila peniana.

El número de espermatóforos que aloja la bolsa de Needham, en individuos de diferentes tallas es muy variable siendo 24 el número máximo encontrado en un macho de 62 mm. de longitud del manto no se registró la presencia de espermatóforos en ejemplares menores de 31 mm de longitud del manto.

A consecuencia de la variabilidad en el número de espermatóforos contenidos en el saco espermatofórico, el estado de repleción de éste no puede ser considerado como indicador de la condición o estado de la gónada.

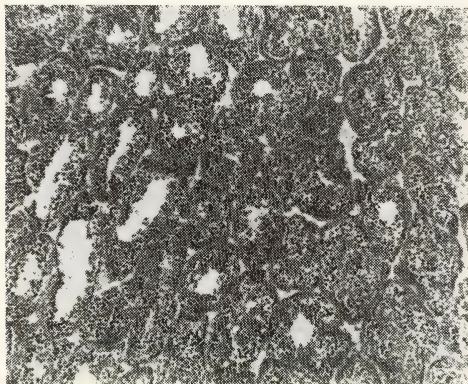
Alcanzada la madurez sexual, la producción de espermatóforos es, por tanto, un fenóno contínuo y el mayor o menor número hallado en individuos de la misma talla —por ejemplo: en machos de 50 mm. de longitud del manto, el número de espermatóforos hallado oscila entre 1 y 16— dependerá de la actividad sexual que desarrolle en ese momento de su ciclo.

No se ha uniformado el criterio para la denominación de cada una de las estructuras que integran el conjunto de "glándulas antexas". Si bien existen algunas diferencias anatómicas entre los sistemas genitales de las especies conocidas es evidente que la estructura general del complejo masculino y el proceso de formación de los espermatóforos es invariable.

Así el conducto deferente distal y la glándula mucígena integran, para Peterson, el "conducto formador del espermatóforo"; Mann et. al. consideran ambos como "sistema glandular I", y, a la gl-angula accesoria como "sistema glandular II". Este mismo autor llama "conducto deferente distal" a la porción que comunica a la glándula accesoria con la bolsa de Needham — = "ducto de Needham" para Peterson—.

Es esta una diferencia importante respecto de lo descripto para **O. tehuelchus** ya que el conducto deferente distal se incorpora a la glándula accesoria y finaliza en ella. Luego el "cuello" glandular se comunica con el saco espermatofórico en su extremo peniano.

La conección bolsa de Needham-pene es, con econjunto, denominado por Mann et al. "ducto espermatofórico terminal" el cual consta de tres porciones, una primera de vehiculización, el divertículo y el órgano terminal o "pene".


23

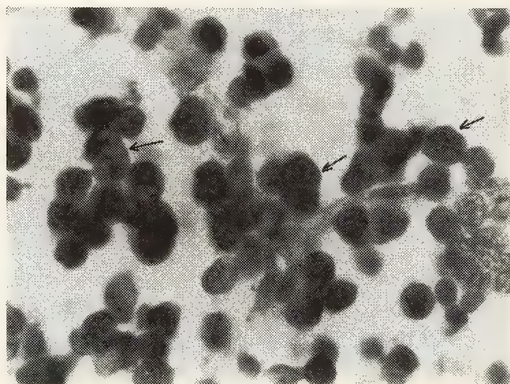
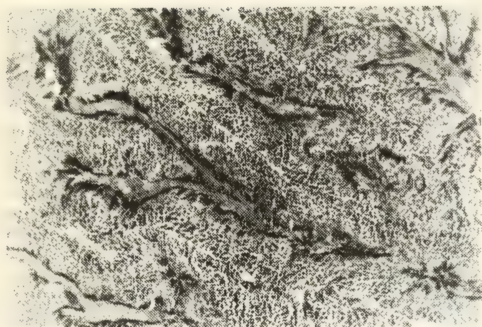
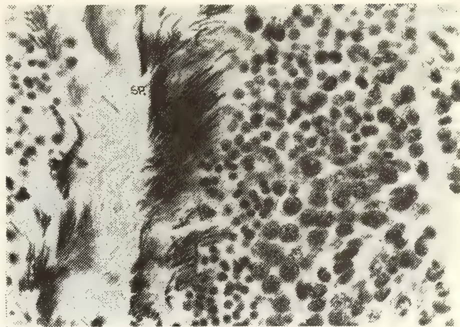

24

FOTO 23. — Sección transversal del testículo. Proliferación y multiplicación gonial. H y E; 100 X.

FOTO 24. — Detalle de 23. Elementos basales en división. H y E; 1000 X.



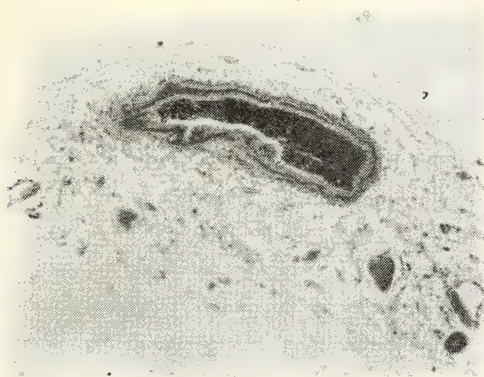
25



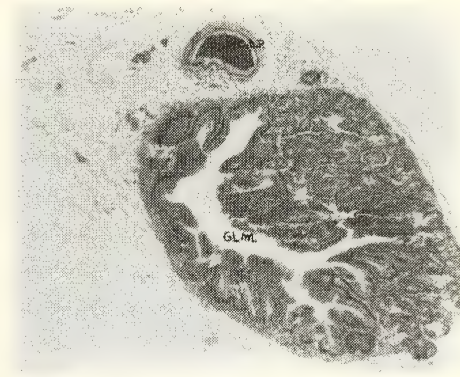
26

FOTO 25.– Túbulos seminiferos con elementos goniales diferenciados. H y E. 40 X.

FOTO 26. – Detalle de 25. H y E; 400 X.



27



28

FOTO 27. – Sección transversal del conducto deferente proximal. H y E; 40 X.

FOTO 28. – Sección transversal del conducto deferente proximal (c.d.p.) y glándula mucígena (gl. m.). H. y E; 40 X.

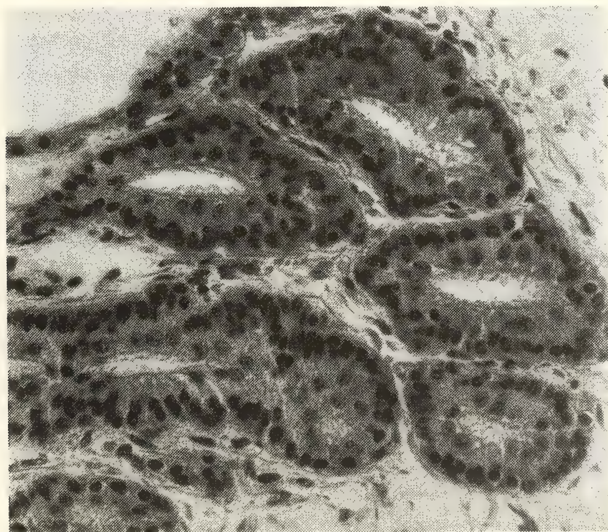


FOTO 29. – Sección transversal de la glándula mucígena. Detalle de 28. H y E; 250 X.

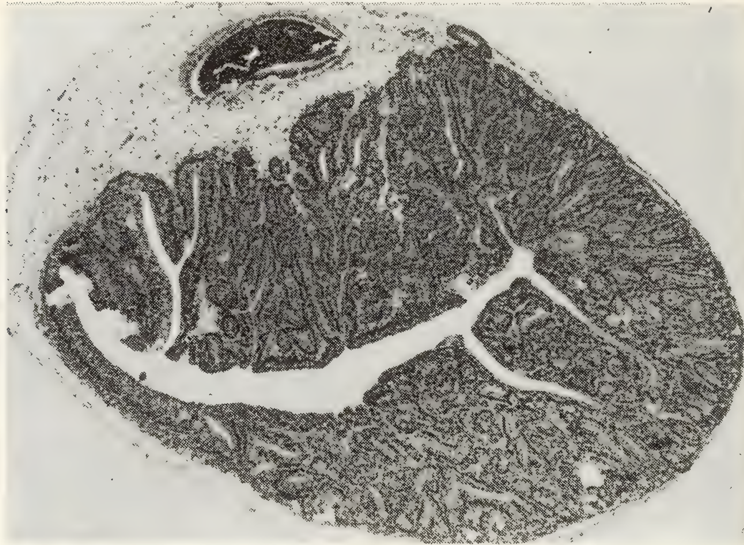


FOTO 30. – Sección transversal del conducto deferente a nivel de la glándula mucígena. H y E; 40 X.

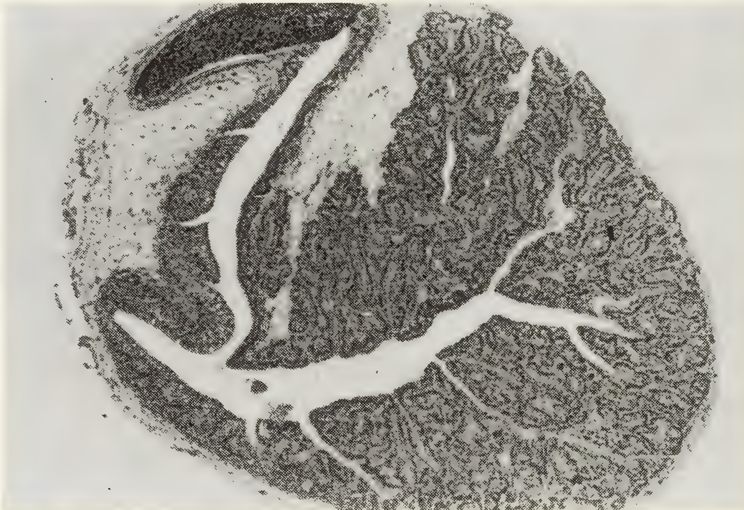
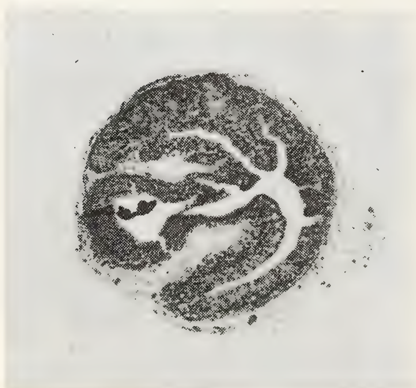
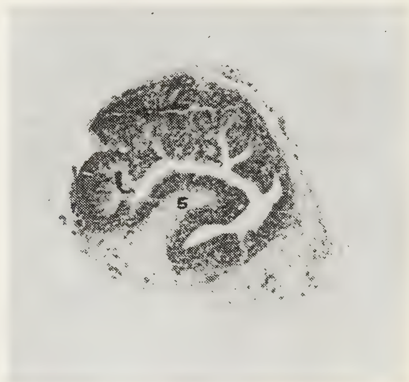


FOTO 31. – Comunicación de la glándula mucígena con el conducto deferente. H y E; 40 X.

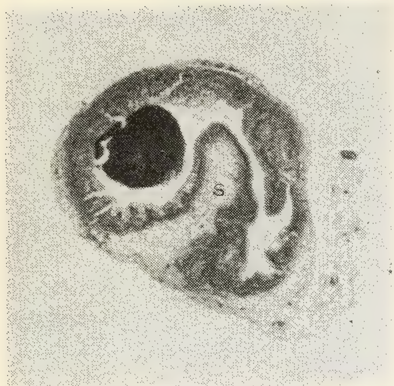


32

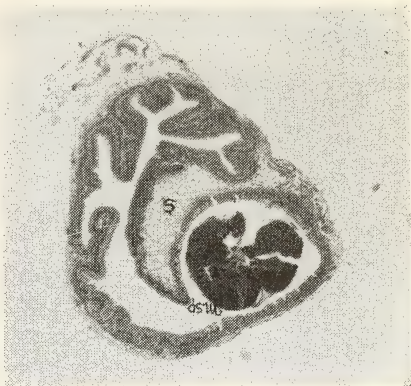


33

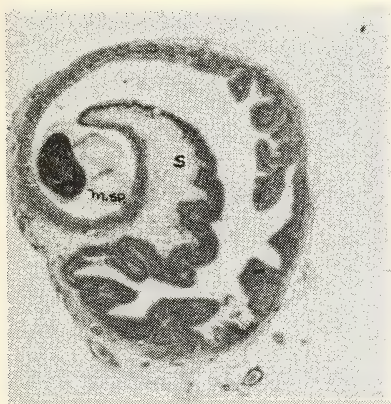
FOTO 32 a 36. – Sección transversal de la primera porción del conducto deferente distal. s: septo; m.sp.: membranas del espermatóforo. H y E; 40 X.



34



35



36



37

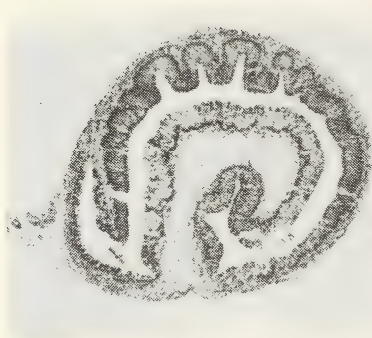
FOTOS 37 y 38. – Corte transversal de la porción media del conducto deferente distal. cr. gl.: cresta glandular. H y E; 40 X.



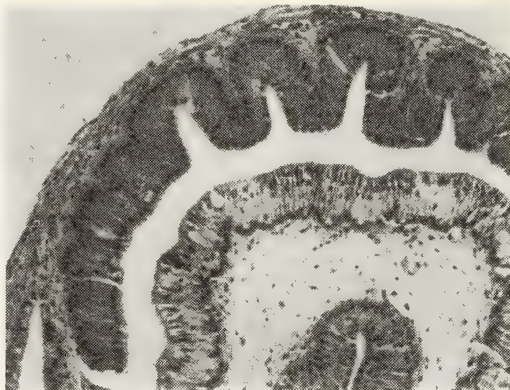
38



FOTO 39. – Detalle de la cresta glandular. H y E; 100 X.



40



41

FOTO 40. – Sección transversal de la última porción del conducto deferente distal. H y E; 40 X

FOTO 41. – Detalle de 40. H y E; 100 X.

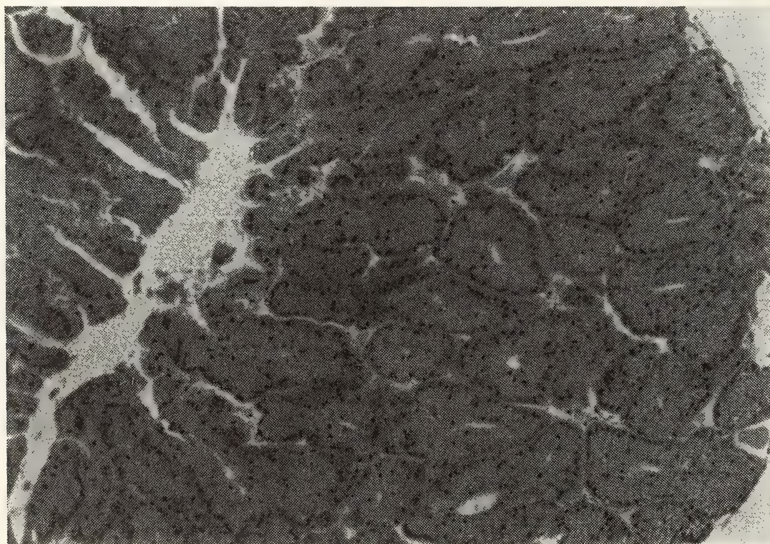


FOTO 42 – Sección transversal de la glándula accesoria. H y E; 100 X.

6.3 Ciclo Reproductor

Describir el ciclo reproductor de una especie implica establecer etapas claramente definibles por las que atraviesa una gónada; ubicando temporalmente dichos eventos en los que resulta fragmentada la real continuidad del fenómeno reproductivo.

Una forma de describir cuantitativamente las variaciones que se operan en los tejidos gonadales a través del tiempo es hacerlo mediante los llamados índices gonadal y de madurez.

La expresión cualitativa de tales transformaciones se encuentra en la escala de madurez propuesta; en la que se anotan las características macroscópicas salientes de genitales y anexos, correspondientes a cada segmento del ciclo.

La integración de ambos aspectos –cuali/cuantitativos– permite obtener una visión de conjunto de la secuencia anual de los fenomenos reproductivos.

6.3.1. Indice gonadal. Su distribución anual.

De cada lote correspondiente al período 1977-1979 se tomó una submuestra representativa sobre la que se determinó el peso total –formolizado– de las gónadas femeninas.

El cálculo del índice gonadal se efectuó refiriendo el peso gonadal a la longitud del manto (obviando de este modo los inconvenientes de índole práctico para efectuar determinaciones gravimétricas "en el campo").

La expresión matemática de tal relación –tomada de Schuldt (1979)– es:

$$IG = \frac{\text{Peso gónada} \cdot 10^4}{(\text{LM cm})^3}$$

Distribución del Indice Gonadal.

Respecto a la distribución del Indice Gonadal se observa (Tabla 3; Gráfico 6) para ambos períodos estudiados, una progresiva caída de su valor promedio a partir de principio del mes de junio; indicando que el período de puesta ya se ah iniciado a fines de mayo, momento en que el índice alcanza su máximo valor. Durante los meses siguientes se acentúa progresivamente esa tendencia, llegando al mes de diciembre en el que para ambos períodos se anotan los valores más bajos del índice considerado.

Lo descripto, sumado a las características macroscópicas que ofrecen las gónadas femeninas indica que los meses julio y agosto delimitan el período durante el que el fenómeno de puesta alcanza su máxima relevancia poblacional. El mes de diciembre queda caracterizado por la irrupción de la nueva generación reproductora cuyos representantes inician la evolución de los tejidos goniales (góandas en M1 y M2) y la presencia de ejemplares con gónadas evacuadas (M4).

Cabe apuntar que en el período señalado, además de anotarse los mínimos valores para el índice gonadal, la dispersión de su valor promedio es también mínima (véase la amplitud del intervalo de confianza calculado en cada caso), avalando lo expresado sobre la significación poblacional de este momento, ya que es indicador de que la mayoría de las gónadas se encuentran en similar condición (madurez incipiente y media).

No ocurre lo mismo en los meses de mayo a julio, en los que la mayor dispersión del promedio del IG es indicadora de una mayor diversidad en la condición gonadal, ya que en tal época existen en la población individuos que están en vías de alcanzar la madurez total en tanto que otros han dado comienzo a la puesta.

En el mes de marzo se advierte el repunte del índice gonadal indicando el desarrollo de una nueva etapa reproductora. Las góandas presentan óvulos en maduración, en algunos casos avanzada y todas las hembras analizadas mostraron esperma en sus oviductos distales.

En el mes de mayo se encontraron hembras cuyas gónadas presentaban características similares a las descriptas para el mes anterior aunque con mayor número de ovas en estado de madurez. En algunos casos el saco ovárico y el oviducto mostraron evidencias de haber iniciado el desove, confirmada esta observación por el hallazgo de algunas puestas en el área de pesca.

En suma, del análisis de la evolución anual del índice gonadal se deduce que un largo período de puesta se inicia a fines de mayo que alcanza su punto culminante en los meses julio-agosto y finaliza en noviembre.

Lo prolongado del período de puesta es característico de los octópodos y en general de todos los cefalópodos.

La Tabla 3 resume los datos referentes a Indice Gonadal, su promedio e intervalo de confianza del mismo, para cada muestra analizada.

TABLA 3

Indice Gonadal Promedio (IG). Desviación Standard (S) e Intervalo de Confianza (IC)

	n	IG	S	IC
6-77	10	753,58	286,67	753,58 ± 204,87
10-77	31	101,09	97,01	101,09 ± 35,18
12-77	11	49,37	46,97	49,37 ± 16,39
3-78	22	114,48	97,18	114,48 ± 43,09
7-78	17	201,83	85,40	201,83 ± 43,91
3-79	49	165,63	146,94	165,63 ± 42,40
5-79	13	152,23	152,23	211,82 ± 92,03
8-79	36	93,77	97,12	93,77 ± 32,70
12-79	29	31,64	51,01	31,64 ± 19,29

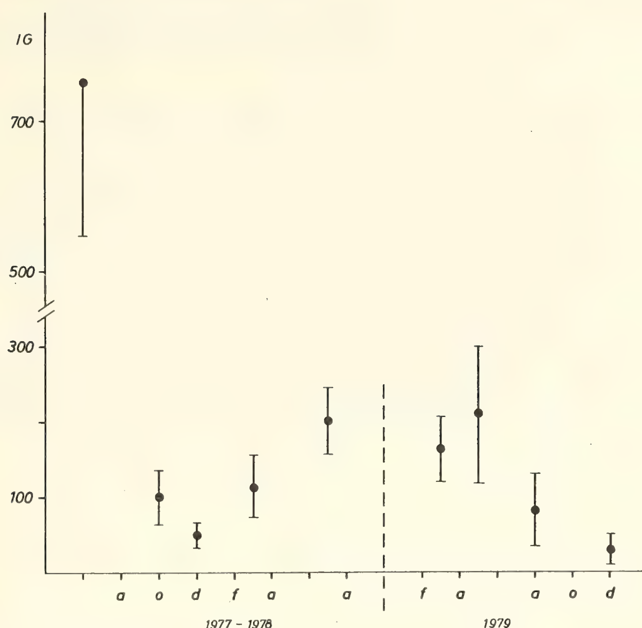
TABLA 4

Indice de Madurez Promedio (IM) – Desviación Standard (S) e Intervalo de Confianza (IC)

	HEMBRAS				MACHOS			
	n	IM	S	IC	n	IM	S	IC
3-79	48	0,101	0,068	0,10 ± 0,020	47	0,296	0,085	0,296 ± 0,025
5-79	13	0,088	0,016	0,088 ± 0,064	17	0,338	0,121	0,338 ± 0,062
8-79	36	0,176	0,120	0,176 ± 0,040	33	0,275	0,129	0,275 ± 0,044
12-79	33	0,276	0,122	0,276 ± 0,043	31	0,173	0,053	0,173 ± 0,063

GRAFICO 6

DISTRIBUCION DEL INDICE GONADAL ($\bar{x}$)



6.3.2. Indice de Madurez

El índice de madurez propuesto por Hayashi (1970) para **Todarodes pacificus Steenstrup y aplicado posteriormente por Guerra (1975) en Octopus vulgaris** Lamarck, evidencia las variaciones que experimenta la relación de peso existente entre los órganos reproductores (masculinos y femeninos) y sus glándulas anexas durante el transcurso de los procesos de desarrollo y maduración gonadal.

La expresión matemática correspondiente para uno y otro sexo es la siguiente:

Machos

$$IM = \frac{Pgla.}{PT + Pgla.}$$

donde:

Pt: peso del testículo (gr.)
Pgla.: peso de los anexos genitales que incluyen: bolsa de Needham, glándula accesoria, conducto deferente y pene (gr.)

Hembras

$$IM = \frac{Povd.}{Porv. + Povd.}$$

donde:

Povd.: peso del oviducto más las glándulas oviductales (gr.)
Pov.: peso del ovario (gr.)

Las determinaciones del índice de madurez de **Octopus tehuelchus** se efectuaron sobre ejemplares pertenecientes a submuestras tomadas al azar de los lotes obtenidos en el último período de muestreo (año 1979). En este caso, previo a las determinaciones gravimétricas, se eliminaron cuidadosamente las membranas que recubren gónada y anexos. Se obtuvieron datos complementarios: diámetro de las glándulas oviductales, coloración de las mismas;

presencia o ausencia de esperma en oviductos; grado de desarrollo dle anexos masculinos; ausencia o presencia y número de espermatóforos almacenados en la bolsa de Needham, etc.

A partir de estas observaciones resulta posible relacionar el valor del índice de madurez (IM) de una gónada determinada con el grado de maduración alcanzado.

De tal modo se establece para cada estadío de madurez, el rango en que oscila el valor de IM.

La consideración conjunta de estos hechos resulta en la elaboración de una escala de madurez que se detalla en el siguiente punto.

El Gráfico 7 representa la relación Peso oviducto y gl. oviductales (Povd) / Peso ovario (Pov) + Povd. –es decir el índice de madurez–. Teniendo nuevamente en cuenta las características de gónada y anexo se delimitan cuatro sectores en los que se agrupan los valores de IM correspondientes a cada estadío de desarrollo gonadal. De igual modo el Gráfico 8 indica la relación Peso glándulas anexas (Pgla) / Peso Testículo (PT) + Pgla.

Otra forma de analizar cuantitativamente las transformaciones de los tejidos gonadales es estudiar la relación ponderal existente entre gónada y anexos –Pov/Povd, para las hembras y PT/Pgla para machos– Las gráficas 9 y 10 muestran el resultado obtenido al contraponer tales parámetros discriminado según el estado de madurez y las rectas de regresión a que se ajustaron los valores observados en cada caso. (Se destaca la dispersión acentuada de los valores para M3 en gráfica 9).

GRAFICO 7

Relación : Peso Ovario + Peso Oviducto (Povd + Pov) / Peso Oviducto (Povd)

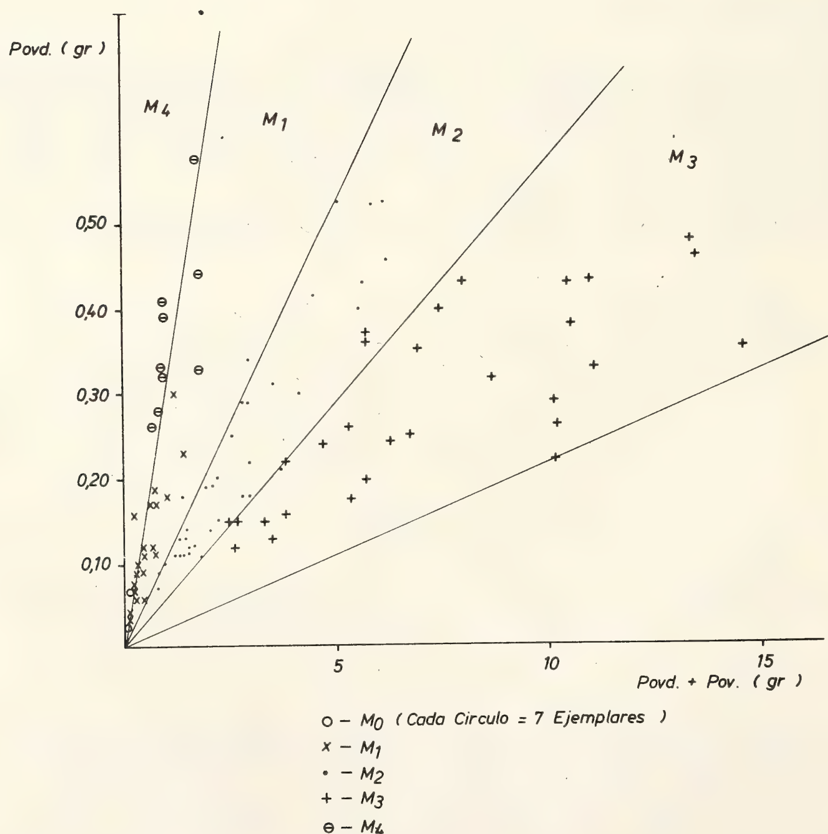


GRAFICO 8

Relación : Peso Testiculos (PT) + Glándulas Anexas (gla) / Peso Glándulas Anexas (Pgla)

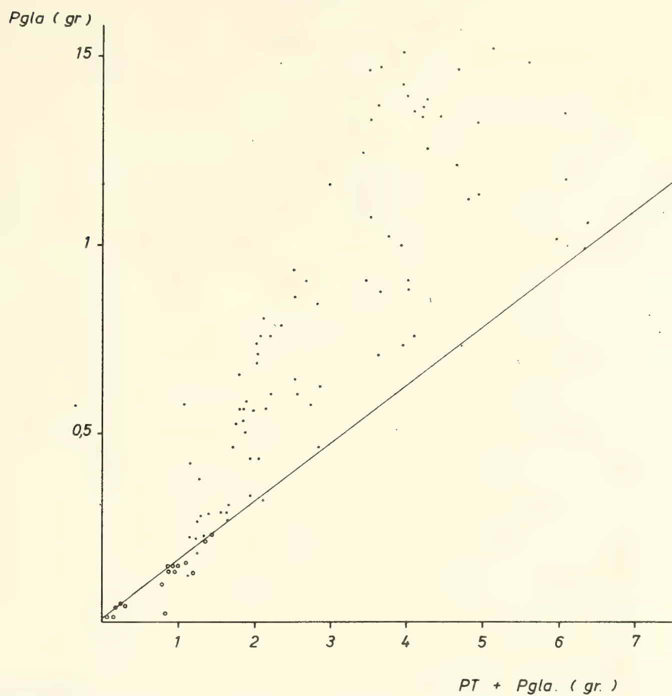
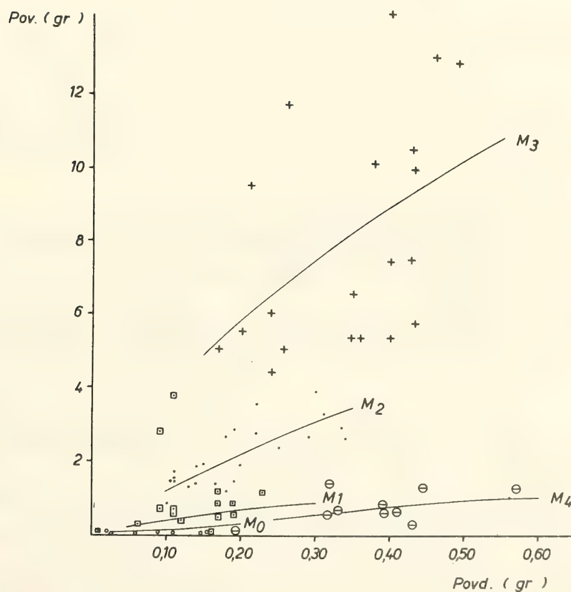


GRAFICO 9 Relación : Peso Ovario (Pov) / Peso Oviducto (Povd)



$M_0 \quad y = 1{,}7881 \cdot x^{0{,}9850}$

$M_1 \quad y = 2{,}4107 \cdot x^{0{,}8119}$

$M_2 \quad y = 8{,}5277 \cdot x^{0{,}8538}$

$M_3 \quad y = 15{,}6841 \cdot x^{0{,}6208}$

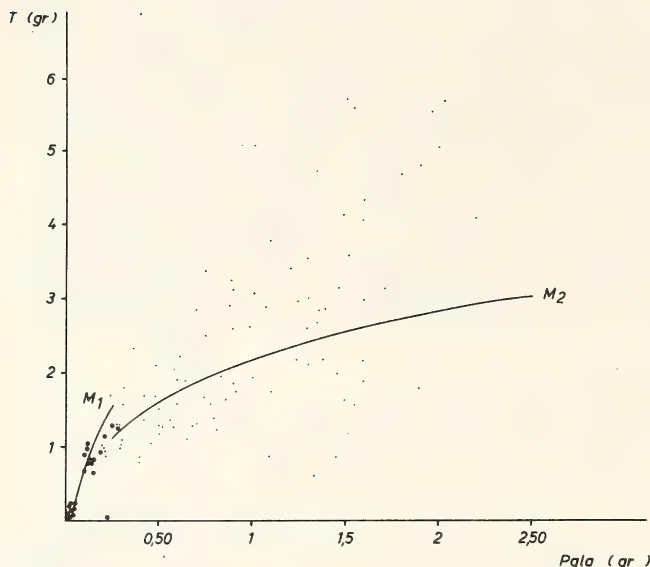
$M_4 \quad y = 16{,}310 \cdot x^{0{,}8616}$

GRAFICO 10

Relación: Peso del Testículo (PT) / Peso Glándulas Anexos (Pgla)

M_1 $y = 5{,}7514 \cdot x^{0{,}9411}$

M_2 $y = 21628 \cdot x^{0{,}3788}$



Distribución anual del Indice de Madurez

La evolución en peso del complejo glandular anexo al testiculo en relación a las variaciones ponderales de este último determina el aumento de los valoresde IM conforme se avanza en el grado de madurez.

Inversamente, el desproporcionado aumento del peso ovárico respecto al del conjunto: oviductos-glándulas oviductales implica una progresiva disminución del IM a través del ciclo madurativo.

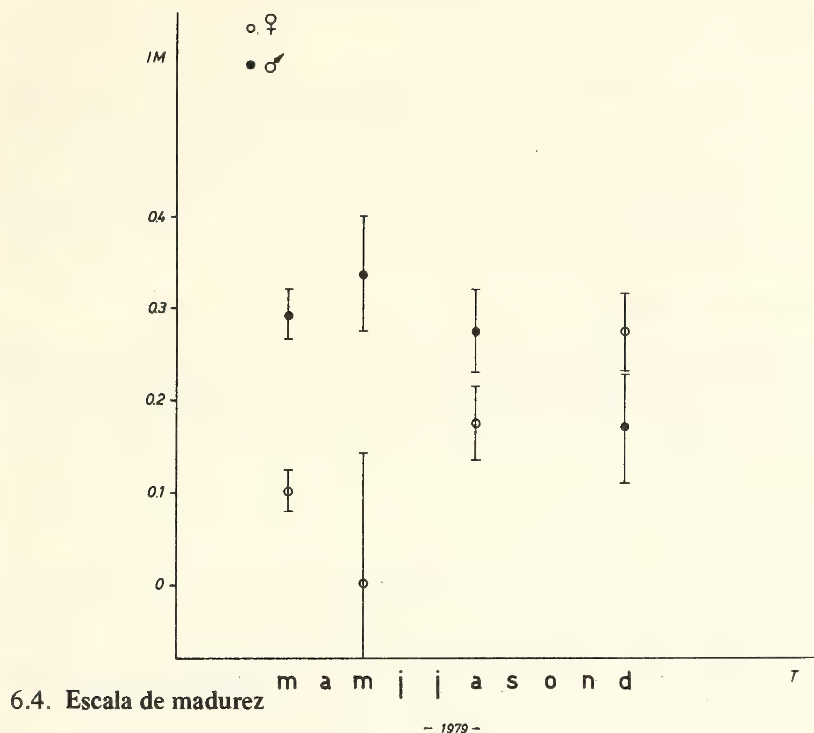
Las consideraciones que se desprenden del análisi de la evolución del índice de madurez en el período 1979 son coincidentes con lo expuesto al tratar las variaciones anuales del índice gonadal.

Se observa en el caso de los machos una progresiva disminución del valor promedio del IM a partir de un nivel máximo alcanzado en el mes de mayo; paralelamente las hembras acusan un incremento del IM luego de un valor mínimo logrado en igual fecha. En ambos casos en el mes de diciembre se alcanzan los valores "límite" para cada tendencia. Gráfico 11, tabla 4.

Los fenómenos madurativos, pues, se desarrollan y alcanzan en ambos sexos su punto culminante en el lapso enero-mayo momento a partir del cual se inicia el dilatado período de desove que logrará su máxima expresión en los tres meses siguientes.

GRAFICO 11

DISTRIBUCION ANUAL DEL INDICE DE MADUREZ ($\bar{x}$)



6.4. Escala de madurez

Hembras

El proceso de maduración en las hembras conduce a un enorme aumento en el volumen del ovario a medida que las ovas maduran en su interior. En esta situación la gónada desplaza el resto de los órganos de la cavidad paleal hacia la región cefálica.

Las variaciones de tamaño, sumadas a las características macroscópicas que ofrecen los oviductos y las glándulas oviductales, permiten, en concordancia con los valores del índice de madurez obtenidos; establecer para las hembras de **Octopus tehuelchus** cinco estadíos en la evolución gonadal.

El intervalo de valores del índice de madurez propuesto para cada estado incluye a la mayoría de las hembras que reunen las características definitorias de tal condición, lo que no niega la existencia de individuos que no respondan a este esquema. Estas variaciones son consideradas como lógicas de un proceso biológico de tal envergadura, en el que establecer límites numéricos definidos responde a una modalidad meramente práctica.

– **Inmadurez virginal (MO)**

Ovario muy pequeño (talla media paorximada 6 mm.). Oviductos transparentes. Glándulas oviductales de reducido tamaño, a penas diferenciadas del ducto; diámetro no mayor de 2 mm. En este estado el índice de madurez alcanza valores superiores a 0,300. (IM ⩾ 0,300).

– **Madurez incipiente (M1)**

Ovario pequeño, su diámetro transverso promedio no supera 1,8 - 2 cm. Glandulas oviductales de tamaño reducido (diámetro aproximado 2 a 3 mm.), color blanco. El índice de madurez oscila entre valores de 0,300 y 0,150 (0,300 ⩾ IM ⩾ 0,150).

En este estadío el saco ovárico contiene ovocitos de los tipos II a VI, señalando estos últimos el inicio de la vitelogénesis, proceso que de aquí en adelante será responsable del notable incremento volumétrico de la gónada.

– **Madurez media** (M2)

Ovario mediano a grande; sensible aumento del diámetro transverso que oscila alrededor de los 3 cm. Las glándulas oviductales toman un color amarillento, estando su diámetro comprendido entre 3 y 4,5 mm. La porción distal de los oviductos comienza a ensancharse, siendo a partir de este momento casi constante la presencia de esperma en los ductos que se visualiza fácilmente por transparencia. El índice de madurez correspondiente es: $0{,}150 \geqslant IM \geqslant 0{,}060$.

– **Madurez avanzada a total** (M3)

Ovarios muy voluminosos, con óvulos maduros y en algunos casos prestos a ser evacuados. Oviductos muy ensanchados; glándulas oviductales de gran diámetro -4,5 a 6 mm-. color pardo oscuro. En todos los casos se detecta esperma en los ductos. Indice de madurez: $0{,}060 \geqslant IM \geqslant 0{,}020$.

– **Post - puesta** (M4)

Ovarios típicamente flácidos, saco ovárico a veces distendido; color gris violáceo; su tamaño se reduce notoriamente –1,5 a 2 cm.–; escaso número de ovas –en regresión– persisten en la zona germinal. Oviductos adelgazados de color grisáceo; glándulas oviductales voluminosas o reducidas. El índice de madurez aumenta bruscamente alcanzando nuevamente valores superiores a 0,300, similares a los correspondientes a MO.
La lamina 2 ilustra las transformaciones morfológicas descriptas.

Machos

El desarrollo gonadal de los machos implica igualmente un aumento progresivo del volúmen gonadal, en este caso testicular, alcanzando un nivel a partir del cual se estabiliza.

Las glándulas anexas sufren una evolución paralela amedida que se forman y almacenan los espermatóforos en la bolsa de Needham. A excepción de dos casos registrados, en conjunto no superan el peso del testículo.

Si bien se observaron gónadas masculinas con signos de agotamiento, en ningún caso la bolsa de Needham se encontró desprovista de espermatóforos.

El proceso de maduración en los machos es contínuo, resultando dificultoso todo intento por discriminar "etapas" en su desarrollo.

Se desconoce la cantidad de espermatóforos mínima y necesaria para que un macho inicie su actividad sexual.

Se han hallado algunos machos –fuera del período de mayor actividad– con índices de madurez elevados (0,062 y 0,497 por ej.), con menor cantidad de espermatóforos que otros individuos con índices más bajos.

Los -ultimos hechos apuntados indican, en suma, que se trata de una etapa compleja, de alta diversidad; en la que no se destacan eventos que permitan fragmentar al período de maduración a través de un esquema que incluya más de dos categorías: Inmadurez (M1) y Madurez (M2).

Cada una de ellas se caracteriza de la siguiente forma:

– **Inmadurez** (M1)

Testículo muy pequeño, color blanco. Complejo de Needham poco diferenciado, sin espermatóforos. Indice de madurez: $IM \leqslant 0{,}130$.

– **Madurez** (M2)

Testículo en creciente aumento de volúmen. Complejo de Needham bien diferenciado, incrementando su volumen con la progresiva acumulación de espermatóforos. Indice de madurez: IM $\geqslant$ 0,128.

6.5. RAZON SEXUAL

El conocimiento de la razón sexual, "sex - ratio", o proporción de sexos constituye un dato de importancia en el estudio de la biología reproductiva de la especie.

Para su estudio se investigaron 903 individuos que resultaron discriminados en 483 hembras y 420 machos.

La determinación del sexo se efectuó en base al análisis de los caracteres sexuales secundarios en el caso de los ejemplares adultos; en individuos de pequeña talla en los que la hectocotilización no es evidente se efectuó por medio de disecciones del aparato genital.

La Tabla 5 resume las proporciones de sexos totales halladas para cada lote. A los datos obtenidos se aplicó la prueba de X^2 a fin de determinar si los desvíos de la proporción 1:1 esperada fueron debidos al azar o a causas reales. Según el test empleado las diferencias en la proporción de machos y hembras no son significativas y debidas al azar en el caso de las muestras correspondientes a los meses: marzo; junio; julio; agosto y diciembre.

La Tabla 6 indica la razón sexual total determinada sobre 903 ejemplares estudiados y su discriminación según clases de talla (longitud del manto) de 6 milímetros.

Sólo en dos de las 13 clases analizadas los desvíos de la razón 1:1 resultaron debidos a causas reales; con diferencias significativas en el caso de tallas comprendidas entre 50-55,9 (X^2 4,92); y altamente significativas en la clase 56-61 (X^2 18,92)

El Gráfico 12 muestra las oscilaciones del porcentaje de hembras alrededor del valor medio del 50% a través del intervalo de tallas considerado.

En resúmen las desviaciones respecto de la razón sexual esperada resultan significativas en las determinaciones efectuadas sobre el total de ejemplares estudiados; a través de las clases de tallas de 50-55,9 y 56-61,9 mm del mismo grupo; y finalmente en la muestra del mes de octubre de 1977.

TABLA 5

Porporción de Sexos Total - Prueba de x^2

	HEMBRAS		MACHOS		X^2
	n	%	n	!	
3 - 77	6	31,57	13	68,43	2,58
6 - 77	27	51,92	25	48,08	0,08
8 - 77	27	43,07	37	56,93	1,56
10 - 77	79	63,20	46	36,80	8,71**
12 - 77	83	53,90	71	46,10	0,93
3 - 78	117	53,42	102	46,58	1,03
7 - 78	27	61,36	17	38,64	2,27
3 - 79	101	53,16	89	46,48	0,76
5 - 79	16	44,44	20	55,57	0,44

En busca de las causas a que pueden responder estos hechos se anota que, como en otras especies de pulpo, las hembras de **Octopus tehuelchus** durante la época de puesta se tornan sedentarias y ofrecen cuidados parentales a los huevos depositados; lo que facilita su hallazgo y recolección.

En el mismo sentido, Mangold Wirz (op. cit.) considera que la relación 50:50 se mantiene a pesar de las desviaciones, en algunos casos importantes. En particular para **Octopus vulgaris** sus observaciones coinciden con las efectuadas para **Octopus tehuelchus**; atribuyendo las desproporciones a favor de lashembras a factores ecológicos (diferencias de hábitat), factores morfológicos (diferencias de talla) y de comportamiento en la época de desove. Sin embargo en general se considera, para la mayoría de los Cefalópodos que las hembras son más numerosas.

Por lo expuesto se considera que **Octopus tehuelchus** presenta una razón sexual compatible con la proporción 1:1.

TABLA 6

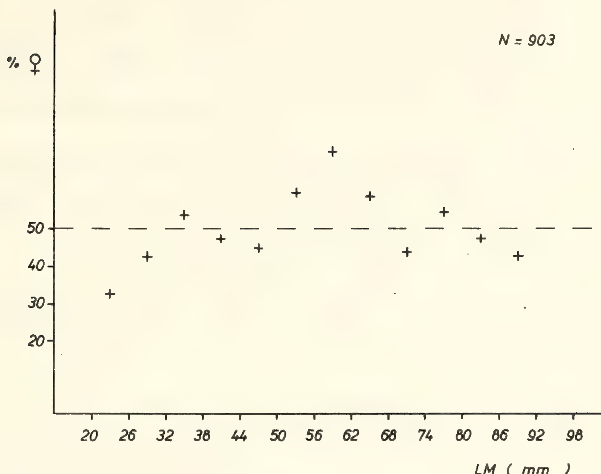
Proporción de Sexos sobre 903 individuos discriminados según clases de 6 mm
Peuba de x^2

Clases	n ♀	%	n ♂	%	x^2
20-25,9	10	32,26	11	67,74	0,05
26-31,9	12	42,86	16	57,14	0,57
32-37,9	28	53,85	24	46,15	0,31
38-43,8	50	47,17	56	52,83	0,34
44-49,9	55	44,72	68	55,28	1,37
50-55,9	76	59,84	51	40,16	4,92*
56,61,9	76	71,06	31	29,98	18,93**
62-67,9	70	58,82	49	41,18	3,71
68-73,9	47	43,52	61	56,48	1,81
74-79,9	35	54,69	29	45,31	0,09
80-85,9	18	47,37	20	52,63	0,11
86-91;9	3	42,86	4	57,14	0,14
92-98	3	100,0	–	–	3,00
TOTALES	483	53,95	420	46,05	4,40*

* Significativo (P 0,05)
** Altamente significativo (P 0,01)

GRAFICO 12

Dristribución del Porcentaje de Hembras Segun Clases de Talla



7. ANALISIS DEL CICLO REPRODUCTOR DE OCTOPUS TEHUELCHUS EN BALIZA SAN MATIAS

La dinámica y comportamiento reproductivo de **O. tehuelchus** responde, en términos generales, al esquema que presentan los Octopodos. Constituyen rasgos comunes sobresalientes:

a. – El tiempo que insume el desarrollo y maduración gonadal –la que se alcanza en el segundo año de vida–.

b. – El prolongado período de desove.

c. – La participación del gureso de las hembras en un solo período reproductivo.

d. – El cuidado que proporcionan a sus puestas.

Esquematizando el ciclo biológico de **O. tehuelchus** se observa:

– El grupo poblacional dominante en marzo –clases 56 a 86 mm.–, mes en que se halla representado un amplio rango de tallas, habrá alcanzado en el mes de mayo su máximo estado de madurez. Si bien se encuentran representados todos los estadíos madurativos, la mayoría de las hembras evidencian madurez media y avanzada.

A partir de fines de mayo/principios de junio, se inicia el período de desove –manifiesto por la caída progresiva del índice gonadal y aumento del índice de madurez en las hembras– que culminará en el mes de noviembre. Difícilmente la intensidad de la puesta sea la misma a lo largo de tan prolongado período. La proporción relativa de hembras desovadas encontradas en agosto parecen indicar que este fenómeno alcanza su máxima expresión en los meses julio-agosto.

El período prolongado de puesta provoca la aparición discontinua y progresiva de juveniels que se suman al grueso de la población –individuos reproductores– hallándose representados todos los estados de madurez. Se distinguen en consecuencia dos grupos: los juveniles y los individuos reproductores en madurez avanzada, desove y post-desove.

Durante la primavera las hembras que han desovado mueren y ya nose hallan representadas en la estructura poblacional de diciembre. El pequeño porcentaje de juveniles que se insinuaba en la estructura del mes de marzo anterior representan ahora la nueva generación –tallas entre 32 y 56 mm.– que dará continuidad al ciclo, encontrándose la mayoría de estas hembras en madurez incipiente y media; –coincidentemente el índice gonadal alcanza su mínima valor y dispersión, y el índice de madurez sus valores inferiores–.

Durante los meses de verano la población se repone para lograr en marzo del año siguiente un amplio espectro de tallas –crecimiento del valor modal de diciembre– y el nuevo grupo de individuos reproductores se afianza y desarrolla para alcanzar nuevamente en mayo el grado de mayor madurez.

Es posible que el primer contingente que alcanza la madurez corresponda al grupo minoritario representado en la población a principios del año anterior, con tallas que no superan los 40 mm. Los grupos de juveniles que se incorporan posteriormente a la población son, a su vez, los que intervienen dilatando el período reproductor.

– Lo analizado hasta el presente conduce a afirmar que las hembras desovan una sola vez en su vida y luego de proteger a sus puestas mueren; –las hembras cuyas gónadas presentan caracteres de post-puesta muestran, ademś, una notable reducción del hepatopáncreas y una condición general disminuida.

La presencia de algunas hembras (representan un pequeño porcentaje dela población) de tallas superiores a los 60 mm., con gónadas en estado de inmadurez y madurez incipiente hacen posible considerar la existencia de un pequeño grupo de individuos reproductores con capacidad de recuperación gonadal y posibles participantes en un segundo período reproductivo.

Aunque no resulta posible establecer si esa condición gonadal –Madurez incipiente e inmadurez– progresará hasta alcanzar la madurez total; se puede deducir que aunque este fuera el caso la incidencia poblacional de tal aporte gamético sería muy escasa.

Mangold & von Boletzky (1973) para **O. vulgaris**; van Heukelem (según cita de Wells, 1975) para **O. cyanea**; Opresco & Thomas (1975) en **O. joubini** y Joll (1976) en **O. tetricus**; han observado en base a experiencias de laboratorio, que las hembras disminuyen su actividad trófica y mueren después de la eclosión de los huevos.

Guerra (1975) precisa que en **O. vulgaris** el grueso de las hembras desova una sola vez en el transcurso de su vida y luego mueren. Las hembras recuperadas en condiciones de sobrellevar un segundo período de puesta representarían al 0,1 % del total.

– Las puestas de **Octopus tehuelchus** se localizan en oquedades de las rocas, grietas o dentro de conchillas vacías de gasterópodos y pelecípodos.

De acuerdo con lo observado en el campo las hembras cubren con sus brazos las puestas, protegiéndolas durante el desarrollo embrionario.

El número de huevos de cada postura oscila entre 40 y 80. Estos miden entre 10 y 12 milímetros de longitud –sin considerar el pedúnculo– y son adheridos al sustrato individualmente.

Los cuidados parentales han sido descriptos para todos los octópodos; las características de las puestas de **O. tehuelchus** sólo son comparables con las descriptas para **O. joubini** (Opresco eta al. op. cit.); esta especie, también bentónica, deposita bajo número de huevos –entre 64 y 134 de 6 mm. de longitud– que fija individualmente. Un patrón de postura similar es evidenciado por **O. luteus** (Arakama, 1962, citado por Wells & Wells, 1975).

– La modalidad reproductiva de los machos que han adquirido la madurez sexual se traduce en un fenómeno contínuo de producción gamética. No obstante ello se detecta un período en que el grueso de individuos masculinos alcanza un pico madurativo.

– Se destaca la existencia de notorio sincronismo en los períodos de máxima madurez para ambos sexos; lo que es evidenciado por los valores máximos y mínimos del Indice de Madurez para hembras y machos respectivamente, en el mes de mayo.

– Las desviaciones del porcentaje sexual a favor de las hembras se vinculan con su comportamiento durante el período de desove y cuidado de la puesta.

El hecho que las diferencias significativas y altamente significativas (según la prueba de X^2) de la proporción 1:1 esperada, sean detectadas para las tallas comprendidas entre 56 y 62 mm. de LM y en el mes de octubre –en coincidencia con los mayores porcentajes de hembras en madurez avanzada y post-puesta, setaría justificado si se asume la ocurrencia de un comportamiento "más sedentario" de las hembras durante el desove que favorecería las posibilidades de su captura viciando el muestreo.

8. CONCLUSIONES

A. – Morfometría y crecimiento relativo

Los caracteres morfométricos de la especie se establecen en base a los siguientes índices:

– Indice Ancho Manto (IAM):

Hembras	x = 69,63;	s = 6,78
Machos	x = 63,82	s = 7,25
Hembras y machos	x = 66,95;	s = 7,55

– Indice Ancho Cabeza (IAC):

Hembras	x = 42,28;	s = 5,05
Machos	x = 40,65;	s = 5,85
Hembras y machos	x = 41,53;	s = 5,49

– Indice de la longitud de la lígula (ILL):

valores comprendidos entre: 1,5-3,5 – 90% de las determinaciones

– Indice de la longitud del calamus (ILC):

valores comprendidos entre: 15-30 – 87% de las determinaciones

El crecimiento relativo del ancho del manto respecto del largo del manto es isométrico en las hembras y alométrico en los machos. El incremento del ancho del manto –respecto de incrementos unitarios de longitud del manto– más pronunciado en hembras que en machos se relaciona al creciente aumento de volumen que experimenta la gónada femenina durante el proceso de maduración.

El crecimiento relativo del ancho de la cabeza –considerando la relación LM/AC– responde al tipo alométrico negativo, siendo esta tendencia más acentuada en los machos.

B. – Reproducción

Hembras:

a) La anatomía e histología de la glándula oviductal evidencian su doble función como estructura de almacenamiento de espermatozoides y secretora. Se detectan dos tipos de secreción: una proteica y otra de mucopolisacáridos ácidos.

b) En la evolución de la serie germinal femenina se establecen seis tipos ovicitarios en base a caracteres citológicos propios de la célula femenina y del eiptelio folicular:

Tipo ovocitario I: ovocitos incluidos en el estroma ovárico.

Tipo ovocitario II: talla ovocitaria: $\overline{x}$ = 54 μ; diámetro nuclear: $\overline{x}$ = 28,25 μ, nucleolo fragmentado; un solo estrato de células foliculares aplanadas –5μ–.

Tipo ovocitario III: diámetro ovocitario: $\overline{x}$ = 108μ. El núcleo –diámetro: $\overline{x}$ = 41 μ –mantiene iguales características que el tipo II. Se origina un segundo estrato de células foliculares –altura $\overline{x}$ [illegible] 6 μ y 8 μ –

Tipo ovocitario IV: Talla ovocitaria: $\overline{x}$ = 180 μ y diámetro nuclear: $\overline{x}$ = 57,25 μ. Desintegración nucleolar. Se esbozan los pliegues foliculares –altura celular $\overline{x}$ = 9 a 12 μ –

Tipo ovocitario V: talla ovocitaria: $\overline{x}$ = 344 μ; diámetro nuclear: $\overline{x}$ = 64,37 μ. Se completa la formación de pliegues foliculares –talla de sus células: $\overline{x}$ = 24 μ –

Tipo ovocitario VI: Vitelogénesis. Diámetro celular de ovocitos maduros: 3,8 mm. y longitud: 10 a 12 mm. Cuando la secreción de vitelo finaliza los pliegues foliculares se retraen.

c) El análisis de los índices de madurez y gonadal, sumadas a los caracteres morfológicos que evidencian las gónadas y glándulas anexas permiten establecer para las hembras la siguiente escala de madurez:

Inmadurez virginal (MO): IM $\geqslant$ 0,300

Ovario muy pequeño. Talla media: hasta 6 mm. Diámetro de la glándula oviductal no mayor de 2 mm.

Madurez incipente (1): 0,300 $\geqslant$ IM $\geqslant$ 0,150

Ovario chico. Diámetro transverso: 1,8-2 cm. Glándulas oviductales: 2-3 mm. de diámetro.

Madurez media (M2): 0,150 $\geqslant$ IM $\geqslant$ 0,060

Ovario mediano a grande: diámetro transverso oscila alrededor de 3 cm. Glándulas oviductales de color amarillento –3 a 4,5 cm.–

Madurez avanzada a total (M3): 0,060 $\geqslant$ IM $\geqslant$ 0,020

Ovario muy voluminoso. Oviductos ensanchados y glándula oviductal pardo-oscuras: 4,5 a 6 mm.

Post - puesta (M4): IM $\geqslant$ 0,300

Ovario fácilo y gris violáceo, a veces distnedidos.
Reducción notoria de tamaño: 1,5 a 2 cm. Glándulas oviductales voluminosas o reducidas.

Machos:

a) En el intervalo: 30-40 mm. de longitud del manto se produce la primera maduración coincidiendo con el rango de tallas donde es posible encontrar o no espermatóforos en formación y/o almacenados en la bolsa de Needham. Es a partir de los 40 mm. que la presencia de los espermatóforos es constante.

b) De acuerdo con el análisis del índice de madurez y la presencia o ausencia de espermatóforos en el saco espermatofórico, se discriminan dos estadíos de madurez:

Inmadurez (M1): IM $\leqslant$ 0,130

Testículo muy pequeño. Complejo de Needham poco diferenciado; sin espermatóforos.

Madurez (M2): IM ⩾ 0,128

Testículo en creciente aumento. Complejo de Needham bien diferenciado; con espermatóforos.

c) El número de espermatóforos completos extraídos de la bolsa de Needham oscila entre 1 y 24 no mostrando correlación con la talla en animales maduros. La longitud de los mismos varía entre 25 y 29,5 mm.

C. – **Ciclo reproductor**

a) En base a la evolución anual de los índices de madurez y gonadal se determina: que el período de desarrollo y maduración gonadal del grueso de la población ocupa los meses de diciembra a mayo; iniciando en junio el largo período de puesta que se extenderá hasta el mes de noviembre.

La producción gamética en los machos es contínua una vez alcanzada la madurez sexual, aunque se detecta un momento de maduración máxima coincidente con el de las hembras.

b) De acuerdo con lo observado, las hembras desovan una sola vez en su vida, cuidan a sus puestas durante el desarrollo embrionario y luego mueren.

Cada puesta agrupa un número variable de huevos –40 a 80– cuya longitud oscila entre 10 y 12 mm. y son cementados al sustrato independientemente uno de otro.

c) Se contempla la posibilidad de que un grupo de hembras logre recuperarse y participar de un segundo período reproductor. Se stima que su incidencia en la población no sería importante.

d) La razón sexual es 1:1. Las desviaciones del porcentaje sexual a favor de las hembras –sobre el total de las determinaciones y en ciertas clases de talla y época del año– se relacionan al comportamiento de las mismas durante el período de desove y cuidado de las puestas.

BIBLIOGRAFIA

BARATTINI, L.P. y URETA, E.H.: La fauna de las costas uruguayas del este. *Cons. depart. de Montevideo*, 193-196, 1960.

BOLOGNARI, A., ALBANESE, C. y ZACCONE, G.: A cytochemical analysis of the follicular cells and the yolk in the growing oocytes of *O. vulgaris* (Ceph, Moll). *Acata Histochem., Allem*, 55: 167-175, 1976.

BURGUESS, L.A.: A study of the morphology and biology of *O. hummelincki* Adam. *Bull. Mar. Sci., 16(4): 762-813, 1966.*

CARCELLES, A.: Catálogo de los Moluscos marinos de Puerto Quequén (Rep. Arg.). *Rev. Mus. La Plata*, Sec. Zool, 2: 267, 1940.

– Catálogo de los Moluscos marinos de la Patagonia. *An. del Mus. "Nahuel Huapi" F. Moreno*, 8:85, 1950.

CARCELLES, A. y WILLIAMSON, S.I.: Catálogo de los Moluscos marinos de la Provincia Magallánica. *Rev. Mus. Arg. Ccias. Nat.*, Sec. Zool., 2(5); 1951.

CASTELLANOS, Z.J.A. de: Catálogo de los Moluscos bonaerenses. *An. de la Com. Invest. Cientif. de la Prov. B.A.*, 8, 1967.

CASTELLANOS, Z. J. A. de y MENNI, R.C.: Sobre dos pulpos costeros de la Argentina. *Neotrópica*, 15(47): 89-84, 1969.

– Nota preliminar sobre distribución de los Cefalópodos del Atlántico Sud-Occidental. Lista de especies incluyendo las del Sector Antártico. An. de la Com. Invest. Cient-ıf. de la Prov. B. A., 1(2): 67-83 (Nueva serie), 1969.

CASTELLANOS,, Z. J. A. de: Nuevas acotaciones sobre pulpos costeros. *An. de la Com. Invest. Cientif. de la Prov. de B.A.*, 2(1): 1-10 (Nueva serie), 1970.

CASTELLANOS, Z.J.A. de y FERNANDEZ, D.: Nuevos Moluscos para Golfo San Matías. Resultados de la Campaña Exploratoria S.A.O./I-1971. *An. de la Com. Invest. Cientif. de la Prov. B.A.*, 193(5 y 6): 225-235, 1972.

COE, W.E.: Sexual differentiation in Mollusks. II. Gastropods, Amphineurans, Scaphopods and Cepahlopods. *Quart. Rev. Biol. U.S.A.* 19:85-92, 1944.

CHRISTIANSEN, H.E.: Reproducción. Olivier, S.R. et al. *Proyec. Desarr. Pesq. F.A.O.*, 27: 37-47, 1971.

DHAIANAUT, A. y RICHARD, A.: Vitellogenese chez les Chephalopodes Decapodes. Evolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitales. *Arch. Anat. micr. Morph. exper, Fr.* 3:183-208, 1977.

DREW, G.A.: Sexual activities of the squid *Loligo pealii* (les) 2. The spermatophore; its structure, ejaculation and formation. *Journ. Morph.*, 32:379-436, 1919.

FRANZEN, A.: Spermiogenesis and spermatozoa of the Cepahlopoda. *Ark. zool.*, 19:323-334, 1966.

FIGUEIRAS, A. y SICARDI, O.: Moluscos marinos del Uruguay. Parte X: Revisión actualizada de los Moluscos marinos del Uruguay con descripción de especies agregadas. Sección II: Gastrópoda-Cephalopoda y Bibliografía consultada. *Com. Soc. Malacológica del Uruguay*, vol. V (38): 179-277, 1980.

FROESCH, D. y MARTHY, H.J.: The structure and function of the oviductal gland in Octopods (Cepahlopoda). *Proc. R. Soc. London* 188(1090): 95-101, 1975.

GOMOT, L.: Analyse experimentale du determinisme du cycle de la gonade chez les Mollusques. *Bull. Soc. Zoool. Fr.*, 95:429-451, 1970.

GUERRA, A.: Determinación de las diferentes fases del desarrollo sexual de *O. vulgaris* L. mediante un Indice de Madurez. *Invest. Pesqueras*, 39(2): 397-416, 1975.
– Distribución y abundancia de *O. vulgaris* en el Atlántico Centro-oriental. F.A.O.; C.E.C.A.F.: E.C.A.F., Serie 78/11: 75-81, 1979.
– Preliminary report on the standaridization of a system of measuring Cephalopods in the C.E.C.A.F. área. FAO Fish. Rep. 220: 181-184, 1979.

GUERRA, A. y MANRIQUEZ, M.: Parámetros biométricos de *O. vulgaris. Invest. Pesqueras*, 44(1): 177-198, 1980.

HAYASHI, J.: Studies on the maturity condition of the common squid I.A method of expressing maturity condition by bumerical values. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 36(10): 995-999, 1970.

JOLL, L.M.: Mating, egg-laying and hatching of *O. tetricus* (Mollusca Cephalopoda) in the laboratory. *Mar. Biol. Germ.*, 36(4): 327-333, 1976.

LEMAIRE, J. y RICHARD, A.: Evolution embryonaire de l'appareil genital: diferenciation du sexe chez *S. officinalis* L. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 95(3): 475-478, 1970.

LISON, L.: Estadística aplicada a la biología experimental. *E.U.D.E.B.A.*, 357, 1968.

MANGOLD WIRZ, K.: Biologie des Cephalopodes benthiques et nectoniques de la mer Catalane. *Vie et Milieu*, Suppl.: 13, 1963.

MANGOLD, K. y PORTMANN, A.: Dimensiones et croissance relatives des Octopodides Mediterraneens. *Vie et Milieu*, Suppl. 17, 213-233, 1964.

MANGOLD, L. y VON BOLETZKY, S.: New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris. Marine Biology*, 19:7-12, 1973.

MANN, T., MARTIN, A.W. y THIERSCH, J.B.: Male reproduction tract, spermathophores and spermatophoric reaction in the giant Octopus of the North Pacific, *Octopus dofleini martini.* Proc. R. Soc. London, (B), 175: 31-61, 1969.

MORALES, E.: Contribución al conocimiento de la biología de *Eledone cirrhosa* (Lam) I. *Invest. Pesqueras*, 1: 31-57, 1955.

MORALES, E. y BAS. C.: Contribución al conocimiento de la biología de *Eledone cirrhosa* (L.) II. Crecimiento relativo. *Invest. Pesqueras*, 15:39-50, 1959.

NAEF, A.: Fauna and Flora of the Bay of Naples. *Monograph* n° 35: Cepahlopoda (systematics). Part I: 1(2). *Zoologische zu Neapel*, 1923.

NIXON, M.: The lifespan in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proc. Malac.* Soc. Lond., *38-:529-540, 1971.*

O'DOR, R.K. y WELLS, M.J.: Yolk protein synthesis in the ovary of *Octopus vulgaris* and its control by the optic glands gonadotropin. *Journ. Exper. Biol.*, 59: 665-674, 1973.

OLIVIER, S., MARZIALE, R. y CAPITOLI, R.: Recursos malacológicos del Golfo San Matías con algunas observaciones realizadas en la Campaña Exploratoria "S.A.O. - I - 71". C.A.R.P.A.S./5/d. Téc. 14, 1971.

OPRESKO, L. y THOMAS, R.: Observations on ***Octopus joubini:*** some aspects of reproductive biology and growth. ***Marine Biol.***, 31: 51-61, 1975.

ORBIGNY, A.: Voyage dans l' Amerique Meridionale. Tomo V, 3ra. parte 27-28, 1835.

PALACIO, F.: A study of Cephalopods from Brazil with a review of Braziliam zoogeography. Ph. D. Dissertation, Univ. Miami: 240 1977.

PETERSON, R.P.: The anatomy and histology of the reproductive system of ***Octopus bimaculoides. Journ. Morph.***, 104: 61-87, 1959.

PICKFORD, G.: Le Poulpe américain: A study of the litoral Octopoda of the western Atlantic. ***Trans. Conn. Acad. Arts. Sci.***, 36:201-811, 1945.

PICKFORD, G. y MC CONNAUGHEY, B.: The ***Octopus bimaculatus*** problem: a study in sibling species. ***Bull. Bingham Oceanogr. Collec. 12(4): 1-64, 1949.***

PUJALS, M.A.: Microanatomía del espermatóforo de ***Octopus tehuelchus*** d'Orbiny (Molllusca: Cephalopoda). ***Neotropica*** 24(71): 51-55, 1978.

RAVEN, C.P.: OOgénesis: the storage of developmental information. International monographs on pure and applied biology. McMillan, New York.

RICHARD, A.: Role de la photoperiode dans le determinisme de la maturation genitale femmelle du Cephalopode ***Sepia officianalis*** L. ***C.R. Acad. Sci. Fr,*** 264 (D): 1315-1318, 1967.
— Action qualitative de la luminiere dans le determinisme du cycle sexual chez Cephalopode ***Sepia officinalis*** L, ***C.R. Acad. Sci. Fr.***, 272 (D): 106-109, 1971.

RICHARD, A. y DHAINAUT, A.: Evolution des cellules folliculaires au cours de l'ovogenese de ***Sepia officinalis*** (Cephalopode). ***C.R. Acad. Sci. Paris,*** 277: 2185-2188, 1973.

ROBSON, G.E.: A monograph of the recent Cephalopoda. Vol. 1 y 2. Printed by Order of Trustees of the British Museum, London, 1929, 1932.

SCHULDT, M.: Contribución al conocimiento del ciclo reproductor de ***Illex argentinus*** Castellanos. ***Com. Invest. Cientif. Prov. B.A. Monografías,*** N° 10; 110, 1979.

SELMAN, K. y ARNOLD, J.M.: An altraestructural and cytochemical analysis of oogenesis in the squid, ***Loligo pealii. Journ. Morph U.S.A.***, 152 (3): 381-400, 1977.

TANAKA, J.: On the stock of ***Octopus (Octopus) vulgaris*** Lamarck, on the East coast of Boso peninsula, Japan. ***Bull. Jap. Soc. Sciet. Fish.***, 24-601-607, 1958.

TARDY, M.J.: Organogenese del'appareil génitale chez les Mollusques. ***Bull Soc. Zool. Fr.***, 95(3): 407-428, 1970.

VOVK, A.N.: Method of determining maturing stages in gonads of squid ***Loligo pealii. Zoologicheskij Zhurnal,*** 51(1): 127-132, 1972.

WELLS, M.J. y WELLS, J.: Cephalopoda: Octopoda, (Capítulo 6). En: Giese, A. y Pearse, J.S.: Reproduction of marine Invertebrates. Moluscos, (vol. 4: Gastropoda and Cephalopoda). ***Academic Press*** London, 4: 291-336, 1979.

WILBUR, K. M. y YONGE, C.M.: Physiology of Mollusca. ***Academic Press*** vol. 1, 1964.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Zulma J. A. de Castellanos la oportunidad que me brindara de trabajar bajo su dirección y el apoyo recibido.

Al Dr. Miguel Schuldt la transmisión franca de sus conocimientos y experiencia.

Se agradece al CISAUA y Gabinete de Medios Audiovisuales de la Facultad de Ciencias Veterinarias las facilidades ofrecidas en la obtención de las microfotografías.

A la Sra. María Luisa Marín por sus bibujos.

El presente trabajo fue realizado por la autora siendo becaria del CONICET, por lo que se deja sentado el agradecimiento a dicha Institución.

SERIE I – CIENCIAS Nº 47

ISSN 0037-8437

VIRUS EN AGUAS

*Luis Alejandro Batiston**

RESUMEN

La contaminación de aguas superficiales y de consumo por un número elevado de especies virales que se multiplican en el tracto eutérico, especialmente a través de descargas cloacales, facilitan una posibilidad de infección para el hombre, aún siendo variable de acuerdo al tipo de virus, concentración y susceptibilidad del huésped. La mayor o menor cantidad que puede tener el agua examinada, las materias orgánicas presentes, la eficiencia de los tratamientos a que son sometidas dichas aguas, son factores que han influido en la posibilidad de fijación de métodos simples, rápidos y económicos de detección de virus entéricos. Por lo tanto, se han estudiado distintas técnicas de concentración de las partículas virales, y se han desarrollado diferentes clases de cultivos primarios y líneas celulares para el aislamiento y la posterior identificación de los virus por técnicas serológicas. Asimismo, se han hecho numerosas investigaciones sobre procesos de tratamiento que varían en su eficacia como removedores de aquellos. Se ha trabajado especialmente en el estudio de los elementos más aptos para la desinfección de las aguas como último y más importante paso del tratamiento. En el Laboratorio de OSN se efectuaron diversas experiencias con líquidos cloacales, lagunas de oxidación y aguas de río, naturalmente contaminadas, y se realizaron concentraciones de aguas de consumo sembradas con cantidades decrecientes de poliovirus 1.

SUMMARY

Pollution of surface and top waters by a great number of viral species that multiply in the enteric tract, specially through sewage, makes the chance of infection easier for man, even being variable according to the virus, concentration, and susceptibility of the host. The larger or smaller amount the examined water can contain, the organic matters present in it, the effectiveness of treatments these waters are submitted, are factors that have influenced on the possibility of setting simple, quick and cheaper methods of detection of enteric viruses. Therefore, different techniques for concen-

----

*) *Responsable del Sector Microbioloía, Dpto. de Laboratorios de O.S.N. (Buenos Aires)*

tration of viral particles have been studied, and different kinds of primary cultures and cell lines have been developed to get the isolation and later identification of viruses by serological techniques. Likewise, a lot of investigations about treatment processes have been performed, and the vary in efficiency as they act in removing the viruses. People have specially worked on the study of the more adequate elements for water disinfection, as the last and more important step of treatment. In OSN Laboratory have carried out several experiences with sewage, oxidation ponds and river waters, naturally contaminated; and concentrations of tap waters, seeded with decreasing quantities of poliovirus 1, have been made.

El problema del agua como posible vehículo de virus patógenos para el hombre no se origina recientemente, sino que ha dado lugar por más de 30 años a múltiples investigaciones en distintos laboratorios del mundo entero, especialmente desde el descubrimiento y desarrollo de los cultivos celulares "in vitro". Asimismo el problema de los virus hídricos ha adquirido nuevas dimensiones si tenemos en cuenta el constante incremento en las necesidades de este elemento para uso urbano o rural, y el aumento paralelo en la contaminación cloacal e industrial de las fuentes en los países más desarrollados.

Como la población del mundo crece a un promedio aproximado del 2% anual, duplicándose cada 30 años, mayores volúmenes de agua deben extraerse de ríos, lagos, etc., para el uso de cada persona adicional. Esto involucra una paradoja de la sociedad moderna, donde cada vez se requiere más y más agua, pero donde resulta cada vez menos alcanzable con niveles lógicos de pureza.

La literatura técnica abunda en discusiones sobre sustancias químicas que no son eliminadas por procesos de tratamiento, y otras no biodegradables que no son afectadas por la autopurificación natural de los ríos. A esta lista debe agregarse el conjunto de virus presente en las aguas, que en muchos casos es notoriamente resistente a los factores ambientales.

Muchos estudios en laboratorios y en el terreno han mostrado la persistencia de la mayor parte de los enterovirus en el medio acuático, por varios días y aún semanas, sobre todo en el caso de aguas muy contaminadas y durante la estación invernal. Shuval, en Israel, ha detectado enterovirus a 25 Km. aguas abajo de una descarga cloacal en el río Jordán, y otros autores han proporcionado evidencias similares de la naturaleza resistente de los virus y de su supervivencia en ríos, lagos y mares, aún en puntos relativamente lejanos del lugar originario de la contaminación (1, 2, 3).

De manera que vemos que el riesgo de polución viral de aguas de consumo o recreacionales, así como aguas residuales pasibles de reciclamiento, debe ser una preocupación esencial, ya que dicho riesgo existe potencialmente, no debiéndoselo minimizar aunque tampoco sobrestimarlo al punto de causar lo que ha sido llamada una "hidrofobia injustificada". Este riesgo está ligado a dos nociones fundamentales: a) **la dosis mínima infectiva**; se ha demostrado que un solo virión en contacto con células sensibles a su acción lítica, en un organismo sin reacción inmunológica, podría constituir esa dosis mínima; b) **el nivel bajo el cual el riesgo de la presencia de tal dosis mínima en el agua sería despreciable**; según algunos autores ese nivel podría fijarse en una unidad formadora de placa (UFP) por 1.000 litros de agua, lo que indicaría las dificultades inherentes a una demostración de este tipo (4, 5).

No debemos olvidar que otros factores, además de la concentración real de virus, determinan si un huesped humano en particular se infectará. Esos factores incluyen el tipo de virus implicado, la vía de penetración y la susceptibilidad del huésped.

Tipos de virus presentes en aguas contaminadas

Aproximadamente poco más de 100 tipos de virus han sido identificados como posibles agentes infectantes del tracto entérico y cuya expulsión se produce por vía intestinal. Así, dichos virus son excretados en las heces de individuos infectados en concentraciones del orden de 10^7 y 10^8 unidades infecciosas por gramo (4, 6, 7).

Este grupo de virus comprende principalmente los siguientes:

a) **Poliovirus:** Son los mejor estudiados. Sus tres serotipos son causantes de parálisis, meningitis, etc. La amplia difusión del empleo de vacunas a virus vivo incrementa la excreción de poliovirus de baja patogenicidad pero que pueden tornarse neurovirulentos en caso de nuevos pasajes por el ser humano.

b) **Coxsackie A y B:** Sus 30 serotipos son responsables de miocarditis, pericarditis, meningitis, afecciones respiratorias, etc. Los del grupo A, generalmente aislados en ratones lactantes, son los menos estudiados.

c) **Echovirus:** Causantes de enfermedades cardíacas y respiratorias y erupciones cutáneas, reúnen 34 serotipos.

En general, este conjunto que constituye el grupo de Enterovirus puede producir enfermedades graves pero, bajo la mayoría de las circunstancias lo hacen sólo en muy pequeña proporción de infecciones. Esto podría ayudar a explicar la escasez de información sobre diseminación de enterovirus propagados por el agua.

La gravedad de una infección en un huésped no inmune está relacionada directamente con su edad. En países en desarrollo, donde la dispersión por el agua es más factible, éste puede ser un factor importante en el proceso de inmunización natural. En dichos países, con predominación de virus no atenuados, las infecciones se adquieren típicamente a edad muy temprana con un riesgo más bajo de enfermedad seria. El mejoramiento en el saneamiento de algunas de estas áreas ha aumentado la poliomielitis paralítica, probablemente porque las infecciones se retardan a una edad más avanzada, más la diseminación del virus no se previene totalmente. En la actualidad quizás ya se esté manifestando una tendencia similar en el caso de enfermedades originadas en otros enterovirus.

d) **Hepatitis infecciosa o tipo A.** Diversos brotes estudiados han llevado a la conclusión de su indudable transmisión por vía hídrica. Asimismo, la epidemia producida en Nueva Delhi en 1955, a raíz de la contaminación de agua potable con líquidos cloacales, demostró la capacidad del virus para resistir altas concentraciones de cloro residual que aparentemente eran apropiadas para la eliminación de la mayoría de los demás agentes enteropatógenos que debieron haber estado presentes.

En los últimos años, estudios llevados a cabo con nuevas líneas celulares han aumentado la posibilidad de cultivos exitosos de este virus, lo que ha estimulado el interés en desarrollar técnicas para su aislamiento y recuperación de distintos tipos de aguas, incluyendo la evaluación de métodos de concentración por adsorción y posterior elución de membranas filtrantes electronegativas y electropositivas. También se ha intentado la recuperación de virus de hepatitis A a partir de ostras y almejas, consideradas posibles vehículos transmisores de la enfermedad.

e) **Rotavirus:** Investigaciones recientes muestran que estos virus, causantes de gastroenteritis, especialmente infantil, han sido detectados mediante técnicas de inmunofluorescencia ó radioinmunoensayos de fase sólida, no sólo en aguas residuales, sino aún en ocasiones en aguas de consumo, mostrando una gran resistencia a los procedimientos convencionales de tratamiento (8, 9).

f) **Reovirus:** Aislados a menudo de aguas superficiales contaminadas, es poco lo conocido sobre su capacidad patógena.

g) **Virus de la gastroenteritis tipo Norwalk:** Reconocidos hace relativamente poco tiempo, muestran semejanza con los enterovirus existiendo por lo menos dos serotipos diferentes.

h) **Adenovirus:** Considerados por lo común virus respiratorios, infectan casi invariablemente el tracto alimentario y se eliminan en abundancia en las heces. No obstante, la enfermedad se suele manifestar cuando otros tejidos, respiratorios o conjuntivales se infectan también. Aunque se han detectado adenovirus en estudios cuyo objetivo principal era la investigación de enterovirus en aguas potables contaminados con aguas cloacales, los únicos casos bien documentados de transmisión por vía hídrica han sido algunos brotes asociados con piletas de natación.

Virus en aguas cloacales

Algunos virus acceden a aguas superficiales directamente de individuos infectados a través de la natación u otras actividades náuticas, o por descargas cloacales de domicilios particulares situados a orillas de ríos o lagos. Sin embargo, la mayoría de los virus entéricos de origen humano se introducen en aquéllas desde los sistemas cloacales urbanos. Estos descargan un amplio espectro de virus con variaciones de concentración de acuerdo a la época del año. De tal manera, virus salvajes tienen generalmente picos de concentración a finales del verano y comienzos del otoño, mientras que los poliovirus atenuados derivados de vacuna, predominantes desde su aplicación en forma masiva, pueden ser hallados durante todo el año sin concentraciones máximas. El virus de la hepatitis A puede ser una excepción importante, pues la incidencia de la enfermedad aumenta en los meses más fríos.

El número de virus recuperados de muestras cloacales depende de la metodología empleada en la concentración de aquéllas. Algunos investigadores han intentado una inoculación directa de muestras en cultivos celulares apropiados. Aunque unos pocos han comunicado concentraciones entre 400 y 10^6 unidades virales por litro, la mayoría ha llegado a la conclusión de que es necesaria una concentración previa para cuantificar el nivel de virus presentes en tales muestras debido al relativamente bajo número que puede ser aislado en determinados períodos de muestreo. Así, en EE.UU., usando diferentes técnicas de concentración se han detectado entre 100 y 400 unidades por litro y menos habitualmente, se ha llegado hasta valores cercanos a las 6.000 unidades por litro. Concentraciones más altas se han determinado en países como India y Sudáfrica, lo que podría reflejar una mayor incidencia de infecciones virales entéricas en esas naciones (2, 10).

Dos factores pueden influir en la certeza de los datos: el primero puede aumentar el número real mientras el otro podría derivar en una subestimación del mismo.

La mayor parte de los recuentos de placas producidas por el virus en una monocapa celular cubierta con un medio semisólido y un colorante vital como el rojo neutro, en forma de áreas limitadas más claras, podrían dar valores más altos que los verdaderos. Esto se debería a la imposibilidad de confirmar como de origen viral todas las placas aparecidas en algunos sistemas celulares sembrados con aguas cloacales o superficiales. Por otra parte, los virus están normalmente asociados en el medio acuático a partículas sólidas que al ser eliminadas durante el proceso de concentración sin una previa elución, originaría una estimación menor a la realmente existente.(11)

De los estudios realizados y teniendo en cuenta los factores mencionados, parecería poco probable que las concentraciones máximas en aguas cloacales sin tratar excedieran las 10.000 unidades virales por litro ó bajaran de 1.000 en igual volumen.

Junto con el número de virus presente se deben considerar otros puntos de importancia: a) la eficiencia del tratamiento en la remoción de virus; b) la porción de aguas residuales que reciben tratamiento; c) la proporción de agua residual que constituye la fuente del agua de bebida.

Datos estimativos indican que plantas de potabilización que utilizan aguas superficiales muy contaminadas no tendrían más del 25o/o del total compuesto por aguas residuales, siendo de desear que éstas hubieran sido sometidas, al menos, a un tratamiento secundario. Este término es aplicado usualmente al procesamiento de líquido cloacal previamente estacionado, mediante uno de estos métodos biológicamente activos: a) filtración por escurrimiento; b) digestión con barros activados; c) lagunas de oxidación.

Estudios de eficiencia en la remoción de los virus sólo se pueden llevar a cabo comparando la disminución de las concentraciones virales con el tiempo, después de añadir una cantidad conocida de virus. Dichos estudios deben basarse en los tiempos reales de detención del agua residual en el sistema de tratamiento. Los porcentajes de eficiencia en EE.UU. han variado desde valorespróximos a cero hasta 99o/o, debido a fluctuaciones en las eficiencias de remoción del proceso de tratamiento y de los métodos usados de recuperación de virus.(12). El agregado de un tratamiento de desinfección puede dar lugar también a resultados no demasiado consistentes. Ello se debería a la presencia de partículas en suspensión que interfieren con la capacidad del desinfectante para producir un efluente libre de virus, y a insuficientes concentraciones de desinfectante residual para un tiempo de contacto adecuado.

En resumen, y a partir de distintos estudios efectuados en los últimos años, se ha considerado que un tratamiento secundario típico produciría una reducción en la concentración viral del orden del 90o/o, con un incremento de uno a cuatro órdenes de magnitud en caso de desinfección ulterior.(13)

Aguas superficiales

Tomando en consideración las cifras antes citadas, por las cuales aguas superficiales con un alto grado de contaminación no sobrepasarían un 25o/o de aguas residuales en su total, y tomando como valor típico aproximado para estas aguas residuales tratadas, el de 1.000 unidades virales por litro, el nivel en la toma de una planta de potabilización estaría en el orden de las 250 unidades virales por litro. Esto es hipotético, en tanto representa la combinación de condiciones extremas a lo largo del camino desde la entrada del líquido cloacal crudo hasta la toma. Algunos estudios realizados muestran aislamientos mucho más reducidos que aquellas estimaciones, con máximos de 38 unidades virales en 380 litros con un gran porcentaje de muestras que resultaron negativas.

No obstante todo lo mencionado precedentemente, datos aislados en algunos países de Europa y Asia indican la presencia en algunas aguas de río y de lagunas valores algo más elevados en la concentración de enterovirus, lo cual aumentaría las dificultades que se presentan durante el proceso de tratamiento, y por consiguiente las precauciones a tomar para la obtención de aguas potables desde el punto de vista virológico.

Aguas de mar

Las aguas de mar como receptoras de efluentes cloacales tratados o sin tratar determinan un gran peligro de contaminación en áreas de crecimiento de mariscos, con la natural amenaza para la salud pública.

Comunicaciones de la Organización Mundial de la Salud han notificado sobre diversos brotes de hepatitis A asociados con el consumo de mariscos crudos criados en

aguas marinas contaminadas con líquidos cloacales.(14) Dichos informes han confirmado que los virus pueden sobrevivir en aguas de mar y en peces y mariscos durante un tiempo suficiente para permitir la transmisión efectiva de la enfermedad a través del medio.

La persistencia de enterovirus en él ha sido demostrada, ya que la inactivación de los virus en el mar es un proceso relativamente lento, produciéndose una reducción aproximada al 90o/o en la concentración en un día, mientras las bacterias coliformes generalmente muestran una tasa de reducción similar en un lapso de pocas horas. Hay informaciones de virus entéricos con supervivencias de más de 130 días en agua de mar mantenida en laboratorio. La temperatura parece ser el principal factor de influencia, pues su descenso prolonga dicha supervivencia. También son considerados importantes para la inactivación de los virus, el antagonismo bacteriano, la presencia de sólidos suspendidos, la salinidad, la radiación solar y el tipo de virus involucrado.

Aguas subterráneas

La aplicación de efluentes cloacales tratados a la tierra mediante el riego o líquidos residuales sin tratar como forma de evacuación, o bien la proximidad de pozos negros, originan el posible riesgo de contaminación viral de las napas subterráneas. La intensidad de la aplicación, la composición y estructura del suelo, el pH y el contenido orgánico y iónico del efluente son factores que afectan dicha posibilidad (15, 16).

La composición del suelo influye en el movimiento de los virus, de modo que suelos arcillosos o que contienen abundante materia orgánica son favorables a la extracción de los virus, mientras suelos que contienen arena o mezclas de arena con guijarros facilitan el pasaje hacia napas más profundas. Se han detectado polio y echovirus en desagües subterráneos, a 1,5 m. de profundidad, demostrando la supervivencia de aquéllos, irrigados por aspersión de un efluente secundario clorado, a la aereación y a la luz solar, así como a la filtración a través del suelo.

Virus que no fueron detectados en pozos a 3 y 6 m. bajo la superficie, fueron hallados después de lluvias intensas, lo que indica su migración a través del suelo, no encontrándose, en cambio, bacterias coliformes.

Un pH alto o una elevada concentración de materia orgánica deriva generalmente en una disminución de la adsorción, la cual es intensificada por la presencia de altas concentraciones catiónicas.

Dado que los factores que influyen en el movimiento de los virus en el suelo no están totalmente aclarados, debe tenerse cuidado al fijar la ubicación de los pozos proveedores de agua potable, con respecto a los lugares donde hay irrigación de efluentes cloacales o pozos negros.

Aguas recreacionales

La natación esencialmente, pero también otras actividades recreativas como el remo o el "surf" constituyen un riesgo potencial de infecciones de origen viral. La ingestión de agua así como el contacto con las membranas mucosas o con heridas en la piel pueden ser puerta de entrada para los virus.

Se considera que las piletas de natación sin un suficiente cloro residual libre, permiten la permanencia y acumulación de los virus, pudiendo producirse la transmisión de conjuntivitis y faringitis por adenovirus y de meningitis por enterovirus. Las piletas bien

mantenidas y desinfectadas parecen representar escaso riesgo de infección, pero los ejemplos de infecciones a partir de piletas en estado inadecuado demuestran que el riesgo potencial existe.

Por su parte se han aislado coxsackievirus B5 de personas que nadaron en lagos en donde se encontró este agente. Asimismo quienes nadan en aguas marinas contaminadas son, proporcionalmente, bastante más afectados que aquéllos que no lo hacen o que nadan en aguas no contaminadas. Se han hallado virus entéricos en balnearios costeros cuyas aguas satisfacían la norma de tener menos de 1.000 coliformes por 100 ml (17).

Detección de virus entéricos

Los virus, que usualmente son excretados en cantidad varias veces menor a la de las bacterias coliformes, al no reproducirse durante su permanencia en los líquidos cloacales por ausencia de células susceptibles, y al sufrir dilución, inactivación y sucesivos tratamientos hasta el momento de su consumo, disminuyen su número en un elevado porcentaje. De tal modo, aunque grandes brotes de enfermedades de naturaleza viral podrían ocurrir por una contaminación masiva de origen cloacal en la fuente de aprovisionamiento, en general, pero especialmente en países tecnológicamente desarrollados, la transmisión de la infección depende de la capacidad demínimas cantidades de virus para producirla(5). Se ha demostrado que la infección puede ser causada por una UFP, pero no se ha determinado el riesgo de infección para un individuo a partir de unas pocas unidades infectivas en la fuente del agua a ser procesada para su consumo.

Todo ello nos lleva a fijar con precisión uno de los problemas claves en este tipo de estudio y que es el de la concentración del agua, problema a resolver a fin de elaborar un método práctico, simple y económico para la detección de ese mínimo número de partículas virales en grandes volúmenes de agua.(18)

Su concreción permitiría, a la vez: a) efectuar estudios cuali y cuantitativos de la ecología viral en aguas de distinto origen, lo que implica cuantificación, identificación y distribución de virus de origen humano y no humano; b) disponer de medios de control de la "potabilidad viral" de un agua de consumo, relativamente rápidos y sencillos, y de la eficacia de los sistemas de tratamiento de aguas superficiales y residuales; c) realizar estudios epidemiológicos, precisando la frecuencia de epidemias virales de origen hídrico y la importancia real que para la colectividad representan las enfermedades transmisibles por el agua.

Los diferentes métodos propuestos demuestran que éste es un problema de no fácil solución. La mayoría presenta una o varias limitaciones.

Algunos son utilizables sólo con reducidas cantidades de agua. Aunque a veces parecen valiosos y relativamente sensibles "a priori", no lo son al usar volúmenes mayores o al emplear aguas que no sean destilada, de consumo o previamente clarificada. Aquellas aguas que normalmente se encuentran cargadas de diversas partículas coloidales o con una gran concentración de materia orgánica complican la tecnología.

En otros métodos se han utilizado concentraciones virales elevadas, que no se pueden comparar con las existentes en la realidad. Otros son de difícil aplicación por el tipo de materiales preconizados o por el alto precio de los mismos. Finalmente, técnicas que se consideraron susceptibles de dar resultados muy favorables, dieron lugar a conclusiones erráticas en distintos laboratorios.

Como paso previo a la concentración propiamente dicha, se deben mencionar los dos tipos de muestreo usados: a) el único que permite una aproximación cuantitativa al problema es aquél que consiste en recoger directamente el agua a utilizar en recipientes de volumen determinado o por medición del agua procesada mediante un caudalímetro.

En este caso el factor a considerar es el volumen de la muestra, que depende de su origen y de su naturaleza, lo que involucra un conocimiento aproximado de la concentración viral; b) el que determina la preconcentración en el lugar por el método de la gasa sumergida durante 48-72 horas, posteriormente tratada con HON a 1N a pH 8-8,5 para favorecer la elución de los virus adsorbidos. Esta técnica, puramente cualitativa, presenta como fallas principales la falta de información sobre el volumen de agua que pasa a través de la gasa y sobre la proporción exacta de virus eluídos en relación a los adsorbidos.

La búsqueda de métodos de concentración de virus en agua se ha basado de preferencia en las propiedades de la partícula viral y sus estrechas analogías con las sustancias proteicas.(19) De tal modo, las siguientes son las principales técnicas ensayadas:

1) Los virus tienen carácter anfótero, siendo su punto isoeléctrico, generalmente, inferior a 7. Por lo tanto, sometidos a la acción de un campo eléctrico a un pH dado, son capaces de migrar en un sentido determinado. Esto ha dado lugar a dos métodos: **electroforésis a flujo forzado**, que origina una adsorción selectiva de partículas virales sobre membranas de diálisis semipermeables, y **electroósmosis**, donde bajo la influencia de una diferencia de potencial el agua se difunde de un costado al otro de la membrana, provocando la concentración de los virus que no pueden atravesarla. Estas técnicas aparecen todavía en estado incipiente. Aunque el procedimiento y el equipo es bastante simple, los pequeños volúmenes que pueden ser procesados en un lapso razonable tienden a hacer de éstos, métodos de valor reducido para concetraciones primarias.

2) La **ultracentrifugación**, relacionada con las características de sedimentación de los viriones sometidos a una fuerza centrífuga, no parece muy promisoria como método de rutina. Sus mayores desventajas residen en el costo y el gran consumo de tiempo para el procesamiento de volúmenes grandes.

3) El tamaño de los virus, que para algunos enterovirus se halla aproximadamente entre 200-300 A° permite la retención de estas partículas en filtros de poro menor al de aquéllos. Así, la llamada **ultrafiltración** resulta otro de los métodos de concentración, el cual presenta el inconveniente de permitir el paso de pequeñas cantidades de líquido, disminuyendo rápidamente la velocidad de filtración.

4) Una combinación de retención y adsorción de los virus sobre **filtros de alginato** permite su concentración, mediante su solubilización en solución de citrato de sodio. Este concentrado, no citotóxico, es luego inoculado. Algunas investigaciones recientes han determinado el agregado de agentes condicionantes de las membranas, gluconato de sodio y Tween 80, para modificar las características filtrantes de dichas membranas y su eficiencia de remoción. Las ventajas de esta técnica radican en su simplicidad, rapidez y economía, y su mayor inconveniente en la rápida oclusión de los filtros cuando se trata de aguas relativamente turbias que requieren una prefiltración.

Las tres técnicas que a continuación se describen han sido las estudiadas más a fondo y cuyos resultados dieron lugar a las conclusiones más alentadoras.

5) La eliminación del agua de la suspensión viral por un procedimiento que implica la difusión osmótica, es la base del método de concentración por hidroextracción, preconizado por Cliver y Shuval. La muestra a tratar es colocada en un tubo de diálisis de celulosa, el cual a su vez es puesto en un recipiente conteniendo un agente hidrófilo, el politilenglicol (PEG). El agua y los microsolutos son adsorbidos por éste, al pasar a través dela membrana semipermeable, la cual no es atravesada por virus y macrosolutos provocando su concentración. Un litro de agua es reducido a unos pocos mililitros mediante un kilogramo de PEG. Hay variaciones en el tiempo necesario según el peso molecular del PEG usado.

Los pasos siguientes incluyen la elución del tubo de diálisis con extracto de carne a pH 9, lo que unido al concentrado mismo previo ajuste de pH a 7,5 es empleado para el ensayo de virus. Si bien son de notar la sencillez del método y los porcentajes relativamente altos de recuperación obtenidos, aquél presenta algunas limitaciones: la con-

centración de sustancias citotóxicas no dializables y la adherencia irreversible de cierto número de viriones a las paredes del saco, lo que disminuye las oportunidades de aislamiento. Asimismo, se debe tener en cuenta que sólo se pueden procesar en forma práctica muestras pequeñas (de hasta un litro), lo que limita su aplicación a aguas con un grado elevado de contaminación. (11, 20, 21)

6) Las propiedades superficiales de los virus les confieren una característica singular: su adsorción a determinadas sustancias, lo cual es aprovechado para su concentración. La recuperación de las partículas fijadas se realiza en general mediante procesos de elución. La adsorción se practica sobre polielectrolitos insolubles, óxido de hierro, resinas intercambiadoras iónicas y sobre todo flocs inorgánicos y membranas filtrantes compuestas de distintos materiales: nitrato de celulosa, acetato de celulosa, fibra de vidrio, etc., que son los que consideraremos brevemente.

En el primero de los casos se utiliza principalmente un precipitado de hidróxido de aluminio. (22). Este proceso probablemente tenga su fundamento en interacciones electrostáticas entre la superficie del virus cargada negativamente y la del hidróxido cargada positivamente y complejos de coordinación entre ambos.

El precipitado es alejado en contacto con la muestra, con agitación suave durante dos horas, y aquél, con los virus adsorbidos es recogido por filtración o centrifugación. Luego de separado es eluído con un buffer alcalino de glicina o con una solución proteinácea (por ejemplo extracto de carne o suero bovino) para su posterior siembra.

Las principales limitaciones de esta técnica estriban en el volumen reducido que es posible tratar (unos pocos litros) y en la recuperación incompleta que se puede lograr. Puede aumentarse este porcentaje si se usa una mayor cantidad de hidróxido, aunque esto deriva en una elución más difícil. Asimismo puedeproducirse paralelamente una concentración de ciertas sustancias citotóxicas, adsorbidas al precipitado junto con los virus. En general, este método ha sido recomendado para el procesamiento de aguas residuales.

7) Finalmente, vamos a considerar la técnica más promisoria en este campo. Las muestras son filtradas bajo presión, a través de membranas filtrantes (generalmente de 0,45 mu, aunque se ha experimentado con membranas de mayor porosidad y aún usando dos o tres en orden decreciente de porosidad) con gran superficie de adsorción. (23, 24, 25, 26, 27). El empleo de cartuchos filtrantes, aunque básicamente utilizan los mismos materiales, ha aumentado la velocidad de filtración y en ciertos casos los porcentajes de recuperación debido a la mayor superficie de adsorción que poseen. (28). El agua es acidificada (pH 3,5) y recibe el agregado de cationes polivalentes como Mg^{++} ó Al^{+++}, en forma de cloruros, de modo de incrementar el grado de adsorción. Después se produce la elución con una solución proteinácea ligeramente alcalina o con un buffer alcalino de glicina –HONa a pH 11,5. El uso de éste último permite una reconcentración del eluído, previo ajuste a pH 3,5, de manera semejante a la primera concentración y en una membrana de diámetro menor. En el primer caso puede someterse el líquido a una precipitación por acidificación a pH 3,5. El precipitado, con los virus adsorbidos, se redisuelve en un pequeño volumen de PO4 HNa 2 para la siembra ulterior.(29)

Recientemente se han evaluado en forma favorable membranas filtrantes más electropositivas que las usadas comunmente (tipo éster de celulosa) y compuestas de tierra de diatomeas, celulosa y mezcla de resinas (Zeta Plus) o de asbesto-celulosa (Seitz).(30) Estas membranas adsorbieron eficientemente poliovirus inoculados en aguas de consumo, sin el agregado de cationes y trabajando a pH neutro o cercano a la neutralidad. Esto eliminaría la necesidad de modificaciones químicas del agua y el consiguiente uso de sistemas bastante elaborados para agregado de las dosis correctas de los distintos aditivos. La eficacia de la elución ha dependido tanto del eluyente como del tipo de membrana. Las combinaciones de glicina –HONa (pH 9,5-10) con las primeras y extracto de carne con las segundas se revelaron como las mejores.

Desde que los poliovirus adsorbidos son recuperados en un alto porcentaje de las

membranas electropositivas mediante el uso de soluciones sólo medianamente alcalinas, hay una disminución en la posibilidad de inactivación de aquéllos. De la misma manera, es posible que estas membranas sean efectivas para la concentración de aquellos virus que son muy inestables bajo condiciones de gran alcalinidad, tal como adeno, reo y rotavirus.

Los métodos que incluyen membranas filtrantes tienen tres desventajas básicas: a) la materia en suspensión tiende a ocluir la membrana, limitando el volumen pasible de ser procesado e interfiriendo posiblemente con la elución; b) materia orgánica disuelta o en estado coloidal puede interferir en la adsorción del virus, presumiblemente por competición por los sitios de adsorción, y hasta un grado tal como para impedirla por completo; c) los virus adsorbidos a materia en suspensión pueden ser eliminados en cualquier procedimento previo de clarificación (11, 25).

Aislamiento e identificación

Los concentrados, especialmente aquéllos derivados de aguas residuales pueden sufrir contaminaciones por bacterias u hongos que desarrollarían en los cultivos celulares. En general, salvo muestras con un alto grado de contaminación, ésta es controlada mediante el agregado de antibióticos y fungicida al concentrado. El efecto de éstos puede incrementarse por incubación de 1 a 3 horas a 37o C luego de aquel paso, y posterior congelamiento a –70° C.

Una contaminación intensiva puede tratarse con cloroformo, manteniendo la muestra mezclada con aquél a 4°C durante una noche. Luego se separa la capa clorofórmica y en el resto se burbujea aire estéril para eliminar los restos de cloroformo disuelto. Podría ser necesaria una exposición ulterior de la muestra al aire en un ambiente estéril, por varias horas, para remover trazas remanentes de cloroformo.(27).

El paso siguiente en la identificación viral consiste en la inoculación de los concentrados en cultivos celulares apropiados y en algunas ocasiones en animales (usualmente ratones lactantes). No hay un sistema celular único y universal para todos los virus entéricos. Algunos de ellos, en especial rotavirus humanos, virus de gastroenteritis tipo Norwalk y hepatitis A (aunque de este último se han realizado ultimamente algunos ensayos exitosos de cultivos "in vitro", como los efectuados en la línea celular PLC/PRF/5, derivada de un carcinoma hepatocelular primario, en Sudáfrica, por Grabow y otros). no pueden ser aislados comunmente en ningún sistema celular. No obstante, la mayoría de los virus entéricos se pueden detectar por el uso de una o más líneas celulares. Pero el número de éstas a utilizar está limitado por razones prácticas y económicas.

Estudios recientes indican que BGM, una línea derivada de riñón de mono verde africano, puede ser comparable en sensibilidad con cultivos primarios de riñón de mono. Sin embargo, la mayoría de las líneas celulares son menos efectivas que los cultivos primarios, aunque se han obtenido algunos aislamientos comparables con líneas como HeLa, originadas en un carcinoma de útero. Algunos de los cultivos primarios, como en el caso de HEK (riñón humano embrionario), parecen ser sumamente sensibles a los enterovirus, pero su obtención se torna cada vez más dificultosa y más cara.

Por su parte, los ratones lactantes fueron considerados esenciales para el aislamiento de coxsackievirus grupo A, aunque investigaciones más recientes indican una sensibilidad muy parecida en la línea RD.

La cuantificación de virus en los concentrados se efectúa por el método de las placas o bien por la determinación del número más probable (NMP) o la dosis infecciosa (50o/o (ID50) o la dosis letal 50o/o (LD 50).

El primero de ellos está basado en el recuento de las placas que se observan por siembra de distintas diluciones en capas monocelulares con un sustrato sólido compuesto por agar. El segundo supone la inoculación de cultivos o animales con volúmenes iguales de distintas diluciones del concentrado y el cálculo de aquellos valores por fórmulas matemáticas.

La técnica de la placa es generalmente más precisa pues un número relativamente grande de unidades infecciosas pueden contarse directamente como áreas localizadas de infección. Sin embargo, el segundo método aparece como más sensible.

Además, en el primero es bastante fácil recuperar virus de las placas formadas, de modo de inocularlos en otros cultivos similares con el fin de obtener virus puro para su identificación.(31).

Esta es llevada a cabo por técnicas serológicas, pero una identificación preliminar del género (entero, reo, adeno) puede ser hecha a veces a partir del procedimiento de aislamiento. Así, virus aislados en ratones lactantes pertenecerían probablemente a los grupos A ó B de coxsackie. También las características del efecto citopatogénico (CPE) darán una idea anticipada del virus.

Los tests de seroneutralización permiten la identificación de los diferentes serotipos de enterovirus mediante los "pools" de antisueros, así como los tests de fijación de complemento y de hemaglutinación-inhibición sirven en el caso de adeno y reovirus. (32, 33).

Por último, debemos hablar sintéticamente de aquellos virus de comprobada incidencia en la transmisión de enfermedades por vía hídrica. Sólo hace pocos años se comenzaron a superar algunos de los inconvenientes que se presentan en la recuperación e identificación de virus causantes, especialmente, de hepatitis A y gastroenteritis. De tal modo, se han comunicado cultivos como el de hepatitis A ya mencionado, o de rotavirus humano en células de riñón de mono verde africano (CV–1), así como el perfeccionamiento de las técnicas de inmunofluorescencia, radioinmunoensayos de fase sólida y microscopía electrónica, para identificación de aquéllos.

Procesos de tratamiento

La mayoría de los brotes de enfermedades virales transmitidas por vía hídrica han ocurrido a partir de aguas no tratadas, con insuficiente tratamiento o por deficiencias en la red de distribución.

Numerosos estudios realizados en los últimos años han mostrado que el procesamiento convencional de un agua de consumo remueve o inactiva virus en seis a ocho órdenes de magnitud. Aplicando la cifra más alta se ha calculado que el tratamiento de un agua que contuviera 300 unidades virales en 380 litros derivaría en un agua con una unidad viral cada 12 x 10^7 litros. Si el mismo tratamiento se aplicara uniformemente a un agua con el máximo teórico mencionado precedentemente de 250 unidades virales por litro (ó 95.000 unidades virales por 380 litros) tendríamos finalmente un agua de bebida con alrededor de una unidad viral en 400.000 litros.

La eficacia de un proceso de tratamiento es, pues, un factor de importancia fundamental en la posibilidad de transmisión del virus.

Si nos referimos ahora exclusivamente a aguas de bebida (hablamos antes del caso de líquidos cloacales) y si exceptuamos la desinfección, es probablemente la coagulación el tratamiento químico más efectivo en la eliminación de virus, especialmente por el uso de sulfato de aluminio o hidróxido de calcio. Mientras en ambos casos una correcta formación del floc, dependiente de la concentración de coagulante, influye en la cantidad de virus removido; el pH, que en el primer caso se debe mantener a niveles cercanos a 6,4, debe ascender en el tratamiento con hidróxido de calcio a valores próximos a 11, donde se produce un rápido incremento de la destrucción viral.(19).

En tratamientos destinados a la disminución de la dureza de las aguas, se han logrado remociones de hasta un 70o/o de polio 1 sembrado, al producirse la precipitación de CO_3Ca. Por el contrario, precipitaciones de 300 mg/l en dureza de magnesio provocaron una remoción mayor de 99,98o/o. El mecanismo de remoción no es conocido, pero es crítica la presencia de magnesio en el agua. Se ha postulado que éste reduce la negatividad del CO_3Ca, permitiendo una mayor proximidad entre éste y los virus cargados negativamente. El $(HO)_2Mg$ que se forma está cargado positivamente y por lo tanto exhibe características de un coagulante que produce los altos porcentajes de remoción citados.

En experimentos con distintos enterovirus y fagos se estudió la reducción de la cantidad de virus por precipitación con 400-500 mg/l de $(hO)_2Ca$. Las menores concentraciones implicaron una menor remoción de virus, la que también fue afectada en forma significativa por los niveles de pH. En general se alcanzaron resultados más satisfactorios al trabajar con pH entre 10,8 y 11,2, obteniéndose entre un 90 y un 99o/o de destrucción. Se ha notado que luego de llegar a un pH en el que la inactivación comienza, incrementos moderados del pH producen altos niveles de inactivación. El mecanismo de este proceso en estas condiciones es causado probablemente por la desnaturalización de la cubierta proteica y ruptura del virus (34).

Los trabajos de Chandhuri y Engelbrecht con $(SO_4)_3Al_2$ evidenciaron la formación inicial de un complejo de coordinación entre los grupos carboxilo de la cubierta proteica del virus (en sus experiencias fueron fagos T2 y MS_2) y el metal.(35) Esto era seguido por la incorporación del complejo al óxido de aluminio hidratado que precipitaba. Los virus, no obstante, no se inactivaban, y se podían recuperar parcialmente del floc, comprobándose también que la presencia de materia orgánica disminuía la cantidad de virus eliminado. Otros autores han hallado distintos valores de remoción según las condiciones de experimentación. De tal manera se ha observado la influencia beneficiosa de la presencia de arcillas en ciertas aguas.

Se ha experimentado también, con resultados no siempre consistentes, y que dependen muchas veces del grado de turbiedad del agua, con el agregado de sales de hierro y de polielectrolitos. Aguas sembradas con polio 1 y fagos T_4 y MS_2, respectivamente, y adicionadas con polielectrolitos sintéticos, solos o con $(SO_4)_3Al_2$, pusieron de manifiesto la escasa eficiencia de los polielectrolitos aniónicos o noiónicos, pero, en cambio, se lograron porcentajes de remoción que alcanzaban el 99,9o/o en el segundo de los casos y algo menores en el primero, al utilizar polielectrolitos catiónicos. La concentración catiónica afecta en forma marcada la remoción de virus cuando se usan polielectrolitos como coagulantes.

En cuanto a los procesos de filtración por arena, aunque los resultados experimentales son a menudo erráticos, aparentemente la filtración lenta es más efectiva que la rápida, y la presencia de coágulos y de materia orgánica atrapada por la arena es el factor fundamental en la cantidad de partículas virales eliminadas del agua.

Siendo entonces incompleta la remoción de virus por los métodos citados, aquélla dependería en forma decisiva de la desinfección a que esas aguas sean sometidas. Este es un proceso complejo, cuya eficiencia está en relación al pretratamiento efectuado para la supresión de las sustancias que pudieran interferir ulteriormente, y en el caso específico de la cloración dicha complejidad comienza con la química del cloro, el desinfectante más usado en el mundo.

Este elemento se hidroliza a pH cercanos a la neutralidad para formar ácido Lipocloroso (HOCl). Pero a medida que el pH se eleva a niveles alcalinos aumenta la concentración de iones hipoclorito (ClO^-), cuya capacidad viricida es mucho menor que la del ácido.(36). Por su parte, la presencia de amoníaco y compuestos orgánicos nitrogenados en el agua, dan lugar a la formación de cloraminas y cloraminas orgánicas. A pH menor de 4,4 virtualmente toda la cloramina está en la forma de tricloramina que imparte mal olor y sabor al agua, aparte de ser ineficaz como desinfectante. En un rango de pH entre

4,5 y 9 coexisten la mono y dicloramina en proporciones diversas según el pH, siendo la segunda la más eficaz en su acción desinfectante, aunque requiere tiempos de contacto bastante más prolongados que el H0Cl.(37).

Por lo tanto, la obtención de niveles adecuados de desinfección implica mantener el agua a pH neutro o ligeramente ácido y la eliminación de amoníaco y materias orgánicas, no siendo esto último de fácil solución. Por su parte, la existencia de materia en suspensión facilita el atrapamiento de los virus por esas partículas, con las consiguientes dificultades para removerlos.

Otros factores inherentes al tipo de virus presente, a la temperatura del agua y al tiempo de contacto, son asimismo determinantes para una dosificación correcta.

Condiciones experimentales distintas nos muestran, por ejemplo, que 1 mg/l de H0Cl destruyó el 99,6o/o de virus coxsackie A5 en alrededor de 100" a 27°C y en 7' a 3-6°C. La misma concentración de $Cl0^-$ destruyó igual cantidad de virus a 27°C en 3,5' y en aproximadamente 30' a 3-6°C. Trabajos comparativos con polio 1 y E coli mostraron la mucha mayor rapidez de remoción de este último con H0Cl a 5°C y pH6, pero una mayor lentitud a 5°C y pH10 por acción de $Cl0^-$. La mayor parte de la destrucción viral y bacteriana ocurre durante los primeros segundos de la cloración, un período durante el cual el H0Cl puede existir brevemente y estar disponible para desinfectar, aunque no ha sido medido. La cantidad de cloro que queda como H0Cl y el lapso en que éste persiste varían de acuerdo al agua, produciéndose oscilaciones en la relación tiempo-concentración de cloro necesaria para una efectiva remoción viral.

Se han efectuado investigaciones paralelas en condiciones y con criterios de desinfección similares (el tiempo requerido para una inactivación del 99,99o/o a niveles de cloro residual de 0,5 mg/l), que incluyeron seis enterovirus. A pH 7,8, ese tiempo varió entre 4,5 a 6,7 minutos en un caso y entre 8 a 39,5 minutos para el segundo experimento. En el primero la inactivación del 99,99o/o de los seis enterovirus al H0Cl a pH6 varió entre 1,4 y 6,8 minutos. A pH 10 el ion $Cl0^-$ requirió de 10 a 150 veces más tiempo, y el virus echo 1, que fuera el más sensible a pH 6, resultó el más resistente a pH 10. Este resultado indicó que el cambio de pH tenía efectos diferentes sobre la resistencia al cloro de virus distintos, agregado a la alteración de las formas de cloro presentes.(38).

Los resultados de estudios relativamente recientes indican que los virus pueden desarrollar una resistencia en aumento al cloro. Se demostró que la progenie de polio 1 sometida repetidamente a cloración, requería alrededor de 2,5 veces más tiempo de exposición que el virus original.(39).

Ultimamente se ha expresado la preocupación sobre una posible diversidad de resistencia entre virus desarrollados en el huésped humano, con respecto a aquéllos adaptados a su replicación en sistemas celulares. De tal modo, se ha criticado el uso de estos últimos en estudios de campo para la determinación de remoción e inactivación por los procesos de potabilización.

Otro factor involucrado en una mayor resistencia viral a la desinfección es la agregación de los virus.(40,41). Aunque los efectos son complejos y parecen ser diferentes con virus diversos, se ha llegado a ciertas conclusiones: a) diferencias demostradas en la resistencia al cloro de hasta 300 veces entre virus agregados y dispersos, lo son en velocidades de inactivación; no hay evidencias de una resistencia absoluta por parte de los agregados; b) el pH y la concentración de cationes metálicos son determinantes en relación a la agregación; c) los agregados naturales parecen ser más estables que los inducidos.

La eliminación o reducción de la turbiedad del agua es otro problema cuya solución se conecta directamente con una mayor eficiencia de la cloración. Los microorganismos, particularmente los virus, tienden a adsorberse en varios tipos de partículas, siendo algunas de las presentes en aguas superficiales, de origen fecal, e impidiendo el contacto directo con el cloro. Distintos estudios han mostrado que algunas clases de partículas como arcillas o fosfato de aluminio utilizado para la concentración de virus, afec-

tan sólo ligeramente las velocidades de inactivación, así como poliovirus asociado a CO_3 Ca era inactivado a bastante menor velocidad que los viriones libres.

En el caso de adsorción sobre materias orgánicas varias experiencias mostraron, por ejemplo, la resistencia considerablemente mayor de complejos virus-residuos celulares a la cloración, ya que aquéllos eran detectados después de una exposición a más de 1,5 mg/l de HOCl por casi una hora. En condiciones similares el virus libre no era detectable después de dos minutos. Es indudable que esta situación de asociación es más representativa de las condiciones naturales que el virus suspendido libremente.

Estudios semejantes realizados con coliformes unidos a sólidos en efluentes cloacales y que brindan conclusiones parecidas, proveen una evidencia indirecta de que virus adsorbidos en dichos sólidos también estarían protegidos.(42).

El desinfectante que compite en difusión con el cloro es el ozono. Ha sido usado intensivamente en Europa por más de 50 años, no así en EE.UU. donde sólo recientemente ha despertado el interés de ciertos investigadores.

Su alto potencial de oxidación, más de 1 1/2 vez el del cloro, y el hecho de dejar oxígeno como producto residual, no formando compuestos tóxicos con sustancias orgánicas, fundamentan este renovado interés. Además, el desarrollo de nuevos materiales en la construcción de ozonizadores y circuitos electrónicos compactos y la declinación en sus costos han contribuido a que se llevaran a cabo nuevos estudios sobre su capacidad bactericida y sobre todo viricida.(43)

La mayor falencia para una aplicación más extendida del ozono es la falta de una relación definitiva entre el porcentaje de remoción de virus y el residuo de ozono que se debe logar, teniendo en cuenta su rápida desaparición, acentuada en el caso de aguas con alto contenido de materia orgánica. En Francia, Coin demostró que unas décimas de miligramo de ozono por litro destruían más del 99o/o de polio 1 en dos o tres minutos en agua destilada, mientras que en aguas de río filtrada era ligeramente menos efectivo.

Resulta de interés comparar los resultados obtenidos con plantas ozonizadoras en Niza, donde las aguas naturales son poco contaminadas y en París, donde el Sena exhibe una polución cloacal e industrial que aumenta año a año. En ambos casos la concentración de ozono es de 2 g/m3, y se empleó el criterio de que deberían quedar trazas de ozono residual luego de un minuto a 20°C o cinco minutos a 10°C. En el primero los resultados fueron óptimos, no hallándose E coli y siendo muy buenas las características organolépticas. En París, en los primeros tiempos se obtenía destrucción total de E.coli pero parcial de Clostridium perfringeus, necesitándose una postcloración en ciertas épocas del año. A medida que la polución ha ido en aumento, los resultados han sido cada vez más irregulares y la postcloración se usa ahora permanentemente.

Al dirigirnos hacia el objetivo de la supresión completa de virus del medio acuático, necesitamos un estudio comparativo que determine qué desinfectante es el más apropiado para cada situación particular. Efectivamente, el cloro es adecuado para aguas claras, libres de amoníaco y sustancias orgánicas. Pero hay cuestiones no del todo resueltas: en qué medida la turbiedad afecta la desinfección?, es preferible el uso de ozono que no es afectado por el amoníaco, cosa que tampoco sucede con el iodo?; cuál es la eficiencia de técnicas como la radiación ionizante o la pasteurización en aguas destinadas a depuración de mariscos?; hasta dónde los productos residuales de algunos desinfectantes y estos mismos pueden llegar a ser tóxicos para el hombre?

Son necesarios, por lo tanto, estudios que comparen los posibles desinfectantes en su acción sobre cepas virales standarizadas y bajo condiciones idénticas.

Virus en aguas. Trabajos realizados en Obras Sanitarias de la Nación

Todo lo explicado anteriormente demuestra la necesidad de la investigación de virus en el medio hídrico como parte de los estudios referentes a la contaminación

ambiental.

De tal manera, y dentro de las limitaciones de distinto orden que se han presentado: económicas, carencia de determinados equipos y materiales, etc., se intentaron algunos trabajos en este campo, en el Laboratorio de OSN, que podrían servir como base para estudios de mayor aliento en un futuro cercano, y que describiremos brevemente.

Así, se efectuó una serie de concentraciones mediante filtración por membranas y elución con extracto de carne, con cantidades variables de virus inoculados (entre 10^7 y 10^2 UFP de poliovirus por litro de agua) en agua destilada, o sea en condiciones prácticamente ideales. No obstante, los porcentajes de recuperación alcanzados, de hasta un 100o/o en algunos casos, mostraron una sensibilidad aceptable.(44).

Posteriormente se estudió la detección de concentraciones variables de polio 1 en volúmenes mucho mayores (hasta 200 litros) de agua de consumo, poniendo el acento en especial en las experiencias con cantidades más pequeñas de virus (alrededor de 0,5 UFP/litro), donde nos acercábamos algo más a posibles situaciones de la realidad. En este caso, la filtración fue realizada bajo presión con posterior elución con extracto de carne. Este fue sometido, como segundo paso, a una floculación orgánica. El flox, luego de disuelto, fue sembrado en líneas celulares adecuadas, y, por el método de las placas, se efectuó el recuento. Hubo porcentajes de recuperación que oscilaron entre 20 y 60o/o aproximadamente, debiendo tenerse en cuenta los cambios, a veces muy grandes, en la composición del agua de bebida que se usó.(45)

Asimismo se realizaron estudios en aguas con mayor nivel de contaminación: Río de la Plata, lagunas de oxidación (La Banda-Sgo. del Estero) y líquidos cloacales crudos y tratados (Aldo Bonzi-Bs.As.). La elección del método de muestreo, ya sea por gasas o por colección directa, se basó en las posibilidades que brindaban los sitios de extracción. Después fueron concentradas por floculación con $(SO_4)_3Al_2$ y el floc fue eluído con suero bovino. En las ocasiones en que las muestras presentaban gran cantidad de sólidos en suspensión, se procedió a centrifugarlas antes de la floculación y los sólidos se eluyeron de manera similar al floc. Los eluídos, previa esterilización con cloroformo, fueron sembrados en los cultivos celulares. En aquellas oportunidades en que no se observó efecto citopatogénico después de un máximo de siete días, se llevaron a cabo hasta dos pasajes ciegos para favorecer un posible enriquecimiento, descartándose luego en los casos negativos. De los positivos se trató de obtener placas, de modo de aislar y tipificar por seroneutralización los virus encontrados.(46).

Conclusiones

No hay duda de que el agua es capaz de transmitir virus patógenos. De hecho, desde el punto de vista epidemiológico, las cifras sobre la incidencia de las enfermedades virales de origen hídrico no indican probablemente el peligro real. Sin embargo, está claro que la tecnología para producir agua potable viorológicamente, es factible de alcanzar. Por lo tanto, dichas enfermedades podrían ser originadas en un tratamiento ineficaz, una falla inesperada en los equipos o una contaminación accidental en los sistemas de distribución. La eficacia de los procesos de tratamiento puede ser vigilada en forma satisfactoria mediante indicadores microbiológicos así como controles químicos y operativos para la detección de posibles deficiencias.

Es posible realizar tests microbiológicos, de modo frecuente y económico en laboratorios convencionales, con resultados confiables en corto tiempo. Las pruebas de control virológico, actualmente no cumplen con esos requerimientos de rapidez, sencillez y economía, y el intentar equiparar los standards bacterianos con número de virus, enfrenta principalmente el problema de la proporción relativa de virus a bacterias que se pue-

den encontrar en aguas usadas como fuentes de aguas de consumo.

Valores calculados de 1:92.000 en la relación virus-coliformes en aguas altamente contaminadas, así como datos experimentales que hacen ascender esas cifras a 1:300.000 nos afirmaría en la creencia de las escasas posibilidades de detectar virus en ausencia de coliformes. Ello no impide insistir en la necesidad de optimizar el tratamiento del agua, lo cual requiere un mayor conocimiento y consiguiente investigación sobre el comportamiento de los virus en el agua, la relación virus-indicadores, el mecanismo y la eficiencia de los procesos de potabilización y la epilemiología de las enfermedades virales transmisibles por vía hídrica.

Referencias

(1) *Prier, J.E.; Riley, R. Significance of Water in Natural Animal Virus Transmission. Transmission of Viruses by the Water Route (G.Berg, ed.) Interscience Publ., New York, N.Y. 287 (1967).*

(2) *Akin, E.W.; Benton, W.H.; Hill Jr., W.F. Enteric Viruses in Ground and Surface Waters: A. Review of their Occurrence and Survival. Proceedings of the 13th Water Quality Conference. 59 (1971).*

(3) *Berg, G.Reassessment of the Virus Problem in Sewage and in Surface and Renovated Waters. Progress in Water Technology 3, 87 (1973).*

(4) *Berg, G. Virus Transmission by the Water Vehicle II. Virus Removal by Sewage Treatment Procedures. Health Lab. Sci. 3,90 (1966).*

(5) *Plotkin, S.A.; Katz, M. Minimal Infective Doses of Viruses for Man by the Oral Route; Transmission of Viruses by tThe Water Route (G.Bergel). Interscience Publ., New York, N.Y. 151 (1967).*

(6) *Berg, G. Virus Transmission by the Water Vehicle I. Viruses. Health Lab. Sci. 3, 86 (1966).*

(7) *Sobsey, M.D. Enteric Viruses and Drinking Water Supplies, J.Amer Water Works Ass. 67, 414 (1975).*

(8) *Hurst, C.J., Gerba, C.P. Stability of Simian Rotavirus in Fresh and Estuarine Water. Appl. Environ. Microbiol. 39, 1 (1980).*

(9) *Smith, E.M.; Gerba, C.P. Development of a Method for Detection of Human Rotavirus in Water and Sewage. Appl. Environ. Microbiol.43, 1440 (1982).*

(10) *Buras, N. Concentration of Enteric Viruses in Wastewater and Effluent. A Two Year Survey. Water Research 10, 295 (1976).*

(11) *Wellings, F.M.; Lewis, A.L.; Mountain, W. Demonstration of Solids-Associated Virus in Wastewater and Sludge. Appl. Environ. Microbiol. 31, 354 (1976).*

(12) *Berg, G. Removal of Viruses from Sewage, Effluents and Waters I. A Review Bull. Wld. Hlth. Org. 49, 451 (1973).*

(13) *Irving, L.G.; Smith, F.A. One-Year Survey of Enteroviruses, Adenoviruses and Reoviruses Isolated from Effluents at an Activated Sludge Purification Plant. Appl. Environ. Microbiol. 41, 51 (1981).*

(14) *Wood, P.C. Guide To Shellfish Hygiene Ginebra, OMS (1976).*

(15) *Wellings, F.M.: Lewis, A.L.; Mountain, W.; Pierce, L.V. Demonstration of Virus in Groundwater after Effluent Discharge onto Soil. Appl. Environ.Microbiol. 29, 751 (1975).*

(16) *Hurst, C.J.; Gerba, C.P.; Lance, J.C.; Rice, R.C. Survival of Enteroviruses in Rapid-Infiltration Basins during the Land Application of Wasterwater. Appl. Environ. Microbiol. 40, 192 (1980).*

(17) *Goyal, S.M. Prevalence of Human Enteric Viruses in Coastal Canal Communities, J.of Water Poll. Cont. Fed. 50, 2247 (1978).*

(18) *Hill Jr. W.F.; Akin, E.W.; Benton, W.H. Detection of Viruses in Water: A. Review of Methods and Application. Water Research 5, 967 (1971).*

(19) *Sobsey, M.D. Methods for Detecting Enteric Viruses in Water and Wastewater. Viruses in Water (Berg, G.; Bodily, H.L.; Lennette, E.H.; Melnick, J.L.; Metcalf, T.G.; eds.). APHA, Washington, D.C. (1976).*

(20) *Shuval, H.; Cymbalista, S.; Fattal, B., Goldblum, N. Concentration of Enteric Viruses in Water by Hydroextraction and Two-Phase Separation.. Transmission of Viruses by The Water Route (G.Berg, ed.) Interscience Publ., New Yor, N.Y. (1967).*

(21) *Farrah, S.R.; Goyal, S.M.; Berga, C.P.; Wallis, C.; Melnick, J.L. Concentration of Enteroviruses from Estuarine Water Appl. Environ. Microbiol. 33, 1192 (1977).*

(22) *Wallis, C.; Melnick, J.L. Concentration of Viruses on Aluminum Hydroxide Precipitates. Transmission of Viruses by the Water Route (G.Berg, ed.) Interscience Publ., New Yor, N.Y. (1967).*
(23) *Wallis, C.; Melnick, J.L. Concentration of Enteroviruses on Membrane Filters, J. Virol. 1, 482 (1967).*
(24) *Rao, N.V.; Labzoffsky, N.A. A. Simple Method for the Detection of Law Concentration of Viruses in Large Volumes of Water by the Membrane Filter Technique. Can. J. Microbiol. 15, 399 (1969),*
(25) *Sobsey, M.D.; Wallis, C.; Hendirson, M.; Melnick, J.L. Concentration of Enteroviruses from Large Volumes of Water. Appl. Environ. Microbiol. 26, 529 (1973).*
(26) *Hill, W.F.; Jakubowski, W.; Akin, E.W.; Clarke, N. Detection of Virus in Water. Sensitivity of the Tentative Standard Method for Drinking Water. Appl. Environ. Micriobiol. 31, 254 (1976)*
(27) *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association 15th. Edition (1980).*
(28) *Farrah, S.R.; Gerba, C.P.; Wallis, C.; Melnick, J.L. Concentration of Viruses from Large Volumes of Tap Water Using Pleated Membrane Filters. Appl. Environ. Microbiol. 31, 221 (1976).*
(29) *Katzenelson, E.; Fattal, B.; Hostoversky, T.; Organic Flocculation: An Efficient Second-Step Concentration Method for the Detection of Viruses in Tap Water - Appl. Environ. Microbiol. 32, 638 (1976).*
(30) *Sobsey, M.D.; Jones, B.L.; Concentration of Poliovirus from Tap Water Using Positively Charged Microporous Filters. Appl. Environ. Microbiol. 37, 588 (1979).*
(31) *Hsiung, G.D. Diagnostic Virology (revised ed.) Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut (1973).*
(32) *Lim, K.A.; Benyesh-Melnick, M. Typing of Viruses by Combination of Antiserum Pools. Application to Typing of Enteroviruses. J.Immunol. 84, 309 (1960).*
(33) *Melnick, J.L.; Rennick, V.; Hampil, B.; Schmidt, N.J.; Ho H.H. Lyophilized Combination Pools of Enterovirus Equine Antisera: Preparation and Test Procedures for the Identification of Field Strains fo Fourty-Two Enteroviruses. Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 268 (1973).*
(34) *Wallis, C.; Melnick, J.L. Virus Concentration of Aluminum and Calcium Salts. Amer. J. Epidemiol. 85, 459 (1967).*
(35) *Chaudhuri, M.; Engelbrecht, R.S. Removal of Viruses from Water by Chemical Coagulation and Flocculation J. Amer. Water Works Ass. 62, 563 (1970).*
(36) *Weidenkopf, S. Inactivation of Type 1 Poliomyelitis Virus with Chlorine. Virology 5, 56 (1958).*
(37) *Engelbrecht, R.S.; Weber, M.J.; Salter, B.L.; Schmit, C.A. Comparative Inactivation of Viruses by Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 40, 249 (1980).*
(38) *Liu, O.C.; Seraichekas, H.R.; Akin, E.W.; Brashear, D.A.; Katz, E.L., Hill Jr.; W.J. Relative Resistance of Twenty Human Enteric Virues to Free Chlorine in Potomac River. Virus and Water Quality: Occurrence and Control. (V. Snocyink V. Griffin, eds.) University of Illinois and USEPA, 13th Nater Quality Conf. 171 (1971).*
(39) *Bates, R.C.; Shaffer, P.T.B.; Sutherland, S.M. Development of Poliovirus Having Increased Resistance to Chlorine Inactivation. Appl. Environ. Microbiol. 34, 849 (1977).*
(40) *Floyd, R.; Sharp, D.G. Aggregation of Poliovirus and Reovirus by Dilution in Water. Appl. Environ. Microbiol. 33, 159 (1977).*
(41) *Young, D.C.; Sharp, D.G. Poliovirus Aggregates and Their Survival in Water Appl. Environ. Microbiol. 33, 168 (1977).*
(42) *Moore, B.E.; Sagik, B.P.; Malina Jr., J.F. Viral Association with Suspended Solids Water Research 9, 197 (1974).*
(43) *Majmudar, S.B.; Ceckler, W.H.; Sprul, O.T. Inactivation of Poliovirus in Water by Ozonation J. Water Poll. Cont. Fed. 45, 2433 (1973).*
(44) *Batiston, L.A.; Poulin de Riviere, M.E.; Caltabiano, A. Ensayo de una Técnica para Identificar Virus en Aguas. 4to. Congreso Argentino de Saneamiento Tucumán (1974).*
(45) *Batiston, L.A.; Poulin de Riviere, M.E. Detección de Enterovirus en Aguas; Sensibilidad de un Método Tentativo para Aguas de Bebida. II Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires (1979).*
(46) *Batiston, L.A.; Poulin de Riviere, M.E. Aislamiento e Identificación de Enterovirus en Aguas con Distintos Grados de Contaminación. 5to. Congreso Argentino de Saneamiento. Santa Fe (1978).*

Impreso en Talleres SUYFER S.R.L.
Estados Unidos 4131 - Buenos Aires -
Argentina ——— Agosto 1986

NORMAS PARA LOS AUTORES

1. ANALES publica unicamente trabajos originales e inéditos ; solamente por excepción podrá incluir trabajos cuya noticia se haya dado por otra publicación.
2. La publicación en ANALES es gratuita. Las separatas que soliciten los autores (o las entidades a que estén vinculados) son con cargo a los mismos. El requerimiento deberá hacerse por escrito y antes de iniciar la impresión.
3. Los autores son personalmente responsables de la tesis y del contenido de sus trabajos y deberán realizar las correcciones de las pruebas de imprenta de dichos trabajos.
4. La Sociedad Cientifica Argentina se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo que sea sometido para publicación en ANALES, si así lo considerara conveniente.
5. Los trabajos deberán ser presentados escritos a máquina, a doble espacio, en papel tamaño oficio o carta, utilizando una sola de las caras del papel y redactados en castellano. Las fórmulas podrán ir manuscritas y deberán ser suficientemente claras para la labor de la imprenta. Los gráficos se dibujarán en tinta china, o por otro medio, de manera tal de permitir la fácil y buena preparación de los clisés ; esto último es aplicable a todo tipo de ilustración. La cantidad será la mínima compatible con las necesidades de la buena comprensión del trabajo. Se procurará que los trabajos no ocupen más de *seis páginas* de Anales en total, incluídas ilustra-ciones y tablas. La publicación de las primeras seis páginas es gratuita ; los clisés y las páginas que excedan de seis serán con cargo a los autores, de acuerdo a la disposición de fecha 4 de septiembre de 1975.
6. Los trabajos, luego de su título, llevarán un resumen en castellano y otro en idioma extranjero, éste último de no más de 150 palabras. Dichos resúmenes deberán señalar el problema planteado, la indicación de los procedimientos y procesos y las conclusiones a que se arribe, y hacer referencia sobre la precisión de los resultados, todo ello de manera sintética.
7. Los escritos originales, destinados a la Dirección de ANALES, serán remitidos a la Administración de la Sociedad, Avenida Santa Fe 1145 (1059), Capital Federal, a efectos de registrar fecha de entrega y posterior envío al Director.
8. La publicación de los trabajos, una vez aceptados, estará sujeta a las posibilidades de la Sociedad y a las exigencias de diagramación de ANALES. La Sociedad se reserva el derecho de determinar la entrega de ANALES en la cual aparecerán los trabajos.